

**Gaschromatographische
Untersuchungen
in der forensischen Toxikologie
mit besonderer Berücksichtigung
der Blutalkohol - Bestimmung**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Manfred Zindler

aus Kiel

1964

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

**Gaschromatographische
Untersuchungen
in der forensischen Toxikologie
mit besonderer Berücksichtigung
der Blutalkohol - Bestimmung**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Manfred Zindler

aus Kiel

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Vidic
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Schenck
3. Berichterstatter: Professor Dr. R. Hänsel



Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 1964

Tag der Promotion: 16. DEZ. 1964

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. V i d i c am Institut für gerichtliche und soziale Medizin der FU Berlin angefertigt.

Herrn Prof. Dr. E. Vidic möchte ich auch an dieser Stelle für die mir in liebenswürdiger Weise stets gewährten wertvollen Ratschläge meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. W. Krauland danke ich für die Freistellung eines Arbeitsplatzes an dem von ihm geleiteten Institut.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I n h a l t

	<u>Seite</u>
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Vorversuche zur Ermittlung optimaler Versuchsparameter	7
1.) Wahl des Schleppegases	7
2.) Abhängigkeit der Analysenzeit von der Geschwindigkeit des Trägergasflusses (v_c) und der Temperatur	9
3.) Abhängigkeit der Zackenhöhe vom Detektorstrom	12
4.) Abhängigkeit der Zackenhöhe und Zackenfläche von der Geschwindigkeit des Trägergasflusses und der Temperatur	14
III. A) Die gaschromatographische Bestimmung des Blutalkohols nach dem Ausschüttelungsverfahren	18
1.) Vorversuche	18
2.) Eichkurven für das Verfahren	20
3.) Reproduzierbarkeit des Verfahrens	24
4.) Diskussion der Ergebnisse	24
B) Versuche zur Entwicklung eines neuen Verfahrens	25
1.) Wahl des Trockenmittels und geeigneter Reaktionsgefäße	25
2.) Menge des Trockenmittels und Temperaturbedingungen	28
IV. Gasreaktionschromatographie (GRC)	31
1.) Wahl der wasserentziehenden Stoffe und Vorversuche	32
2.) Wahl des inerten Trägers	35
3.) Adsorption von reinem Calciumhydrid und Bestimmung der Mengen für größere Wasserproben	37
4.) Verminderung der Calciumhydrid-Menge und Verwendung einer Doppelsäule	39
5.) Diskussion der Ergebnisse	40
V. Versuche zur Auftrennung der niedrigen aliphatischen Alkohole und ihre Abtrennung von Aethanol	42
A) Herstellung der Säulenfüllungen	42
1.) Bearbeitung des Rohres	43
2.) Bearbeitung des inerten Trägers	43

	<u>Seite</u>
3.) Aufbringen der flüssigen Phase	44
4.) Aufbringen mehrerer flüssiger Phasen	44
B) Konstruktion einer Verdampfungskammer	51
C) Enteiweißung von Blutseren	52
D) Ermittlung optimaler stationärer Phasen für die Auftrennung der niedrigen aliphatischen Alkohole	55
1.) Erprobung von Säulen mit einer flüssigen Phase	58
2.) Erprobung von Kombinationssäulen	62
E) Vorschläge für ein Routineverfahren mit der Kolonne Nr. 70025 (Alkoholkolonne Fa. Beckman)	69
F) Vorschläge für ein Routineverfahren mit einer Diglyzerinkolonne	75
1.) Wahl der Säulenkombination	75
2.) Spezifität des Verfahrens	76
3.) Optimale Bedingungen für die Funktion der Vorsäule	77
4.) Optimale Bedingungen für Probegröße und Detektorstrom (Reinigung der Spritze, Aussalzeffekt)	79
5.) Zusammenfassung der ermittelten günstigsten Arbeitsbedingungen	80
6.) Quantitative Auswertung und Eichkurven	81
7.) Streuung der gaschromatographischen Bestimmungen	85
8.) Nachweisgrenze für Aethanol	86
9.) Bestimmung von Methanol und Aceton neben Aethanol	87
10.) Der Einfluß der Detektorstromstärke und der Geschwindigkeit des Gasflusses auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	87
11.) Die serienweise Anordnung von Vorkolonnen	89
12.) Diskussion der Ergebnisse	92
VI. Gaschromatographischer Trennungsgang zur Identifizierung flüchtiger Giftstoffe in Blut und Körperflüssigkeiten	97
1.) Versuche zur Auffindung einer polaren Trennkolonne	105
2.) Die Ermittlung einer apolaren Trennkolonne	112
3.) Die Ausschüttlung der Substanzen des Trennungsganges	117

	<u>Seite</u>
4.) Eichkurven	119
5.) Die Auftrennung der Gruppenglieder	119
6.) Eine Kolonne für die Schnellanalyse	125
7.) Schema des Trennungsganges	126
VII. Feststellung von toxisch wirkenden Substanzen bei Alkoholvergiftungen	127
1.) Wahl des Trägergases und Einstellung optimaler Versuchsbedingungen	128
2.) Die Auswahl der Säulen	135
3.) Eichkurven	139
4.) Ergebnisse der Untersuchungen	139
5.) Diskussion	146
Tabelle der Säulen (Tab. 16)	149
Chromatogramme	152
Zusammenfassung	161
Literatur	166

I. Einleitung und Problemstellung.

Die Gaschromatographie (GC) stellt wie jedes chromatographische Verfahren ein zweiphasiges System dar. Die bewegliche Phase ist stationär und kann entweder aus einem Festkörper mit hohem Adsorptionsvermögen (Gasadsorptions-Chromatographie, GAC) oder aus einer mit Flüssigkeit imprägnierten stationären Phase bestehen (Gasverteilungs-Chromatographie, GVC), zwischen beiden Verfahren gibt es Übergänge. Die GAC, die vornehmlich von HESSE (24), CREMER (25, 26), GLÜCKAUF (27, 28), CLAESSON (29), TSCHACHOTIN (36), JANAK (37, 38, 39), PATTON (40) und anderen erarbeitet wurde, dient vornehmlich zur Trennung von Gasen, sowie von bei gewöhnlicher Temperatur flüssigen Kohlenwasserstoffen.

Die GVC wurde erst 1952 durch die bahnbrechenden Untersuchungen von MARTIN u. SYNGE (21) eingeführt, die ein Gemisch flüchtiger Fettsäuren auftrennten. Obgleich die GVC erst ein relativ junges Verfahren darstellt, ist sie wegen verschiedener Vorzüge, wie geringer Probemengen, gleichzeitiger qualitativer und quantitativer Aussagen mit automatischer Registrierung, großer Schnelligkeit, sowie hoher Empfindlichkeit innerhalb kürzester Zeit, besonders in der Petrochemie so intensiv bearbeitet worden, daß es heute fast unmöglich erscheint, die gesamte Literatur zu überblicken. Wegen dieser Fülle (es erscheinen jährlich 1000 - 1300 GC-Arbeiten) sei vor allem auf die Monographien von KAISER (1), BAYER (2), KEULEMANNS (3), sowie auf die Zusammenfassungen von RIGHI (19) und JOHNS (20) verwiesen.

Deshalb soll auch nicht auf alle Einzelheiten eingegangen werden, sondern nur auf das Prinzip des angewandten Gerätes und einiger optimaler Versuchsparameter. Eine GC-Apparatur besteht mindestens aus folgenden Teilen: dem Thermostaten mit den Trennkolonnen, dem Detektor, der mit Trägergas ge-

füllten Bombe, dem Druckregler und der Probeneinlaßöffnung.

Als Trägergas dienen am häufigsten He, Ar, H_2 und N_2 . Bei den Arbeiten mit dem GC 2 der Fa. Beckman Instruments wurden ausschließlich H_2 und N_2 verwendet. An sich sind die etwas schwereren Gase infolge kleinerer Diffusionen günstiger für die Trennwirkung, doch treten diese Überlegungen gegen die wesentlich gesteigerte Empfindlichkeit des Wärmeleitfähigkeits-Detektors bei Verwendung von H_2 zurück. Für die Menge des Gasflusses (f_c) gibt es ein Optimum, das abhängig von der Art der Probe, der Type der Kolonne und deren Länge ist. Doch ist dieses Optimum nicht übermäßig scharf, so daß die f_c in weiten Grenzen variiert werden kann. Zu kleine f_c verschlechtert die Trennung, weil sich die Diffusion stärker auswirken kann; zu hohe f_c vermindert die Trennung ebenfalls, weil die Gleichgewichtseinstellungen zwischen flüssiger und gasförmiger Phase unvollständig sind. Über den Einfluß der f_c auf Zackenhöhe und Retentionszeit (t_R) gibt Abschn. IIa Auskunft.

Der Druckregler mit Manometer dient zur Herstellung der notwendigen Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende der Säule. Es wurden fast ausschließlich Säulenvordrucke von 0,8 bis 1,5 atü eingestellt, die im optimalen Bereich lagen.

Als Probeneinlaß dient bei dem Gerät ein Gasventil. Für flüssige Proben ist eine Injektionsöffnung mit Gummiverschluß vorhanden. Die Dosierung erfolgt mit der Mikrospritze der Fa. Beckman. Die Proben wurden möglichst klein gehalten, da die Trennwirkung einer Kolonne mit steigender Probemenge (DE WET, 35) rasch abnimmt. Die Injektionen sollen möglichst rasch erfolgen, da sonst die Proben mit einem zu großen Volumen des Trägergases verdünnt werden (SILICIO, 32).

Der Thermostatenraum dient zur Aufnahme einer oder zweier Säulen, etwaiger Hilfseinrichtungen, sowie des Detektors. Höchste Temperaturkonstanz ist erforderlich, da sich sonst die Trennungen und vor allem die quantitativen Aussagen stark verändern. Die Trennungen sollen bei möglichst niedriger Temperatur erfolgen (VAUGHAN, 22).

Jede Temperaturerhöhung führt zu einer Verschlechterung der Auftrennung, da sich bei höheren Temperaturen die Gleichgewichte zwischen gasförmiger und stationärer Phase schlechter einstellen können. Diese Beobachtung konnte im Laufe der Versuche häufig bestätigt werden. Außerdem wurden mit der Unterbringung mehrerer Säulen im Thermostatenraum schlechte Erfahrungen gemacht. Da der Thermostatenraum nur von unten beheizt wurde, trat ein Temperaturgefälle auf, das die Reproduzierbarkeit ungünstig beeinflusste. Die Thermostaten-temperatur sollte nicht mehr als $20-30^{\circ}\text{C}$ unter dem Siedepunkt der höchst siedenden Komponente des zu analysierenden Gemisches liegen, da sonst zu lange Retentionszeiten resultieren. Die Versuche zur Bestimmung des Blutalkoholgehaltes wurden deshalb fast ausschließlich bei 100°C vorgenommen.

Der wichtigste Teil des gaschromatischen Apparates ist die Kolonne. Der Mantel besteht meist aus Kupfer - oder Stahlrohr, das spiralförmig gebogen ist, um auch längere Kolonnen im Thermostatenraum unterzubringen. Die Säulenfüllung besteht aus einem imprägnierten, inerten Träger. Als inerte Träger werden Teflonpulver, Kochsalz, Seesand, Kaliumkarbonat und vor allem Sterchamol (Schamottmehl) verwendet. Für die selbstangefertigten Trennsäulen wurde nur Sterchamol angewendet, weil dessen Korngröße eine einwandfreie Füllung mit geringem Gaswiderstand zuließ.

Da der Durchmesser der Trennsäule der Trennleistung umgekehrt proportional ist, wurden Röhren von nur 5,5 mm Innendurchmesser verwendet. Über die Vorbehandlung, Imprägnierung

und Füllung der Säulen siehe Abschn. V,A.

Als flüssige stationäre Phase dient eine Reihe von Substanzen mit hohem Siedepunkt und niedrigem Dampfdruck von stark polarem bis apolarem Charakter. Ein Ausdruck für ihre thermische Belastbarkeit ist die Temperaturgrenze, die in der Tabelle der Säulen im Anhang angegeben ist. Für die stationäre Phase gilt gleiches wie für die Solventien (*similia similibus solventur*): Gleiches soll Gleiches trennen. So ist z.B. eine stark polare Diglyzerinkolonnen zur Trennung eines Benzingemisches völlig ungeeignet.

Die Analysenzeit soll immer die kürzeste Zeit sein, in der eine genügende Trennung zu erzielen ist. Über ihre Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Gasflusses (f_c) und der Temperatur gibt Abschn. II, 3-4 Auskunft. Zu einer genügenden Trennung reichen auch bei hochwirksamen Säulen, wie im Laufe der Versuche festgestellt wurde, gewöhnlich erst Retentionszeit-Differenzen von 15 - 20% zwischen zwei aufeinander folgenden Substanzen aus.

Als Detektoren dienen in der Gaschromatographie vornehmlich die Wärmeleitfähigkeitszelle (WLD), die Gasdichtewaage, der Strahlen-Ionisationsdetektor, sowie der Flammenionisationsdetektor (FID), der von SCOTT (23) entwickelt wurde. Zur Anwendung kam vor allem der WLD, erst später auch der FID. Die Messung mit dem WLD ist eine Vergleichsmessung zwischen der Wärmeleitfähigkeit des reinen Trägergases in der Vergleichszelle und der Leitfähigkeit des mit der Analysesubstanz beladenen Trägergasstromes in der Meßzelle. Die beiden Zellen sind nach Art einer Wheatstone'schen Brücke geschaltet. Das Brückensignal betätigt den Zeiger eines Kompensationsschreibers, der das Meßergebnis automatisch registriert. Die Empfindlichkeit des Detektors ist abhängig vom Widerstand des Meßdrahtes, der Temperatur der Zelle, der Natur des Trägergases, der f_c und vom Detektorstrom

(siehe Abschn. II,5).

Die quantitative Auswertung erfolgte ausschließlich nach der Zackenhöhenmethode (s. Abschn. V.C,4), die eine optimale Methode darstellt, solange die Retentionszeiten nicht zu lang und vor allem die Zacken scharf sind. Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten durch Mischchromatogramme und durch den Vergleich der t_R an Säulen ungleicher Polarität.

Um die Gaschromatographie auch für Probleme der forensisch-toxikologischen Analyse nutzbar zu machen, wurde dem hiesigen Institut ein Gaschromatograph GC2 der Firma Beckman Instruments als Leihgabe von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt ⁺⁾ .

Die Analyse der niedrigen aliphatischen Alkohole speziell des Aethanols ist schon sehr ausführlich bearbeitet worden. Doch konnten die meisten Verfahren vor allem für Trennungen aus biologischem Material isolierten Stoffe nicht voll befriedigen. Vor allem war noch kein gaschromatographisches Routineverfahren für Blutalkohol bekannt, das in der Leistung neben dem Widmark-, ADH- oder Vidic-Verfahren bestehen konnte. Deshalb sollten zunächst einige gaschromatographische Verfahren überprüft werden und Vorschläge für eine routinemäßig anwendbare Methode zur Analyse von Aethanol und anderer flüchtiger Substanzen in Blut und Organen gemacht werden (Abschn. I - V). Ferner sollte für einige leichter flüchtige, toxikologisch wichtige Verbindungen ein Trennungsgang ermittelt werden, um die schwierige Analyse dieser Substanzen durch ein einfaches und spezifisches Verfahren zu verbessern.

Auch hierbei wurde auf ein Arbeiten im wässrigen System Wert gelegt, um das Verfahren zu vereinfachen und Ausschüttungsfehler zu vermeiden (Abschn. VI).

⁺⁾ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die Leihgabe des Gerätes auch auf diesem Wege gedankt.

Ferner sollte festgestellt werden, ob bei **Alkoholvergiftungen** mit relativ niedrigen **Aethanolgehalten** noch andere toxisch wirkende Substanzen, vornehmlich **Fuselalkohole**, eine Rolle spielen. Diese Untersuchungen, die einen hoch empfindlichen Detektor verlangten, waren erst nach Erhalt des **Flammenionisationsdetektors (FID)** möglich (**Abschn.VII**).

Um mit der Apparatur vertraut zu werden und die **günstigsten Bedingungen** für einige Versuchsparameter zu ermitteln, waren zunächst orientierende Vorversuche erforderlich.

II. Vorversuche zur Ermittlung optimaler Versuchsparameter.

1.) Wahl des Schleppgases.

Die hervorragenden Trenneigenschaften in der Gaschromatographie beruhen zum großen Teil auf der geringen Viskosität der verwendeten mobilen Phase, die es ermöglicht, lange Trennsäulen mit hohen theoretischen Bodenzahlen zu verwenden. Die Theorie der Trennleistung geht von der Modellvorstellung aus, daß die Trennsäulen aus aneinandergereihten Abschnitten bestehen, die den Verteilungselementen z.B. einer Craig-Verteilung entsprechen. Ein solcher Abschnitt heißt theoretischer Boden, seine Höhe wird HETP (height equivalent of a theoretical plate) genannt.

Als Schleppgas sind in der Literatur (KAISER (1), BAYER (2), KEHLEMANN (3)) verschiedene Gase diskutiert worden. Da als Detektor eine Wärmeleitfähigkeitszelle (WLD) vorhanden war, wurde als Schleppgas Wasserstoff (H_2) gewählt. Wie ein Blick in die Tab. 1 der Wärmeleitfähigkeit von Gasen zeigt (aus RIGHI, 19) ist H_2 das Gas mit der höchsten Wärmeleitfähigkeit. Da die Detektion mit Hilfe des WLD eine Differenzmessung ist, und die meisten zur Analyse gelangenden organischen Substanzen relativ zum Wasserstoff eine wesentlich geringere Wärmeleitfähigkeit besitzen, wird dadurch die Anzeigeempfindlichkeit enorm gesteigert.

Tabelle 1

Substanz	Wärmeleitfähigkeit gamma (cal cm ⁻¹ s ⁻¹ Grad ⁻¹)	gamma relativ zu Luft bei 100°C
H_2	4021	6.803
He	3480	5,53
N_2	577	0.99
O_2	587	1.03
Ne	1110	1.84
CO_2	348	0.7

Wasserstoff besitzt außerdem die geringste Viskosität und ist daher auch für geringe Schleppgasdrucke geeignet. Für seine Verwendung spricht außerdem der niedrige Preis und die große Reinheit.

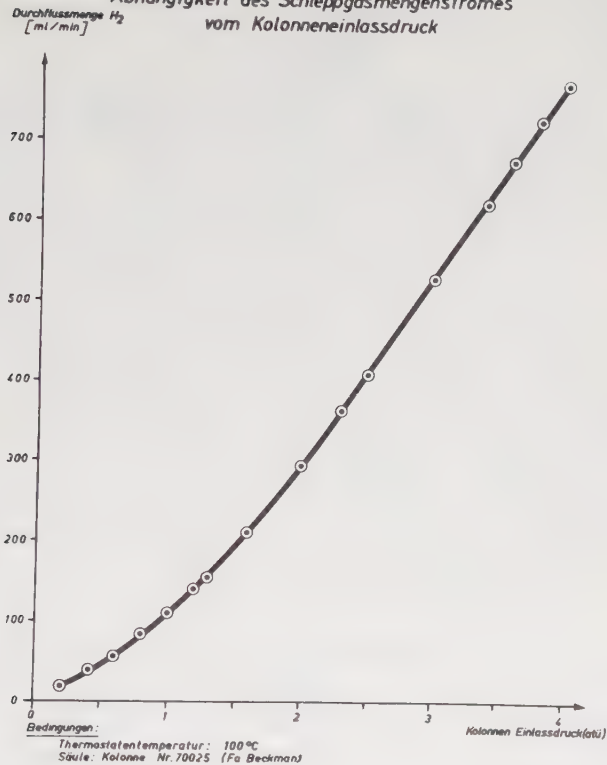
Wasserstoff H_2 hat ferner den Vorteil, daß bei den großen Differenzen der Wärmeleitfähigkeiten zwischen Trägergas und organischer Substanz die Anzeige des WLD über weite Bereiche linear ist (SCHOMBURG, 30). Die Nachteile des Wasserstoffs liegen in seiner Reaktionsfähigkeit mit reduzierbaren Substanzen. Ferner ist auch die Explosionsgefahr (Knallgas) zu beachten. Deshalb wurden auch bei jedem Ein- und Ausbau der Säulen die Anschlüsse durch Überpinseln mit Seifenlösung auf Gasdichtheit geprüft.

Diese Nachteile finden sich beim Helium nicht, das auch eine hohe spezifische Wärmeleitfähigkeit besitzt und somit das ideale Schleppgas darstellen würde. Doch kam die Anwendung des hohen Preises wegen nicht in Frage.

Der Druck von 150 atü der Wasserstoffflasche wurde durch ein Reduzierventil auf ca. 2 - 3 atü gebracht, eine Feineinstellung erfolgte durch ein in das Gerät eingebautes Manometer, mit dem Drucke von 0 - 5 atü genau einstellbar sind. Da ein Strömungsmesser nicht zur Verfügung stand, andererseits aber ein genauer Überblick über die pro Min. durch das Gerät strömende Wasserstoffmenge notwendig war, wurde eine Eichkurve aufgestellt, welche die Abhängigkeit von Säuleneinlaßdruck und Schleppgasmengenstrom wiedergibt. Dazu wurde das aus der Detektorzelle ausströmende Gas in einer pneumatischen Wanne volumetrisch gemessen und dabei der Säulenvor-
druck variiert. (Graphik 1) Die Werte gelten streng nur für die Alkoholkolonnen (Beckman Nr. 70025), für jede Säule mit abweichender Länge und anderem Gaswiderstand ist eine eigene Eichkurve anzufertigen.

GRAPHIK 1

Abhängigkeit des Schleppgasstromes
vom Kolonneneinlassdruck



II,2) Abhängigkeit der Analysenzeit von der Geschwindigkeit
des Trägergasflusses (f_c) und der Temperatur.

Die Analysenzeit bei der Gaschromatographie kann durch Erhöhung der Kolonnentemperatur bzw. Vergrößerung des Schleppgasstromes verkürzt werden. Allerdings geht dies auf Kosten der Trennleistung der Säule, da die Gleichgewichte zwischen gasförmiger und flüssiger Phase sich nicht mehr so gut einstellen können. Dadurch wird die HETP vergrößert und die Zahl der theoretischen Böden sinkt. Diese Verhält-

nisse wurden für die 4 Alkohole Methanol, Aethanol, Propanol und Isopropanol quantitativ untersucht. (Tab. 2 u. 2a, Graphik 2)

Tabelle 2

t_R von

f_c (atü)	t_0	Methanol	Aethanol	Isopropanol	n -Prop.
0.4	1'40"	5'30"	8'15"	10'17"	18'17"
0.8	45"	2'42"	3'41"	4'35"	7'57"
1.0	34"	1'52"	2'50"	3'28"	6'5 "
1.4	23"	1'15"	1'48"	2'20"	4'2"
1.8	16"	56"	1'21"	1'43"	3'

Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C

Empfindlichkeit: 50 x

Detektorstrom: 300 mA

Probe: 20 µl eines Gemisches aus aliquoten Teilen der
4 Alkohole.

Tabelle 2a

t_R von

Säulen- einlaßdruck in atü	t_0	Meth.	Aeth.	Isoprop.	n -Prop.
0,4	1'25"	3'5"	4'4"	4'41"	7'49"
0,8	42"	1'23"	1'50"	2'8"	3'33"
1,0	32"	1'8"	1'25"	1'37"	2'47"
1,4	23"	43"	56"	1'3"	1'47"
1,8	16"	34"	45"	50"	1'20"

Bedingungen wie Tab. 2, nur Thermostatentemp. gesteigert
auf 130° C

So bewirkte z.B. die Erhöhung des Einlaßdruckes von 0,4 atü auf 1,8 atü für Aethanol eine Verringerung der t_R von 8'15" auf 1'21", d.h. die Analysenzeit ermäßigte sich auf ein Sechstel. Beim n-Propanol verringert sich die t_R sogar von 18'17" auf 3', d.h. wenn die Trennleistung der Säule es zuläßt, kann eine Viertelstunde Zeit eingespart werden.

Eine andere Möglichkeit, die Analysenzeit zu verkürzen, liegt in der Erhöhung der Arbeitstemperatur. Dazu wurde die Kolonnentemperatur auf 130° C gesteigert und die sonstigen Bedingungen konstant gehalten (Tab. 2a, Graphik 2).

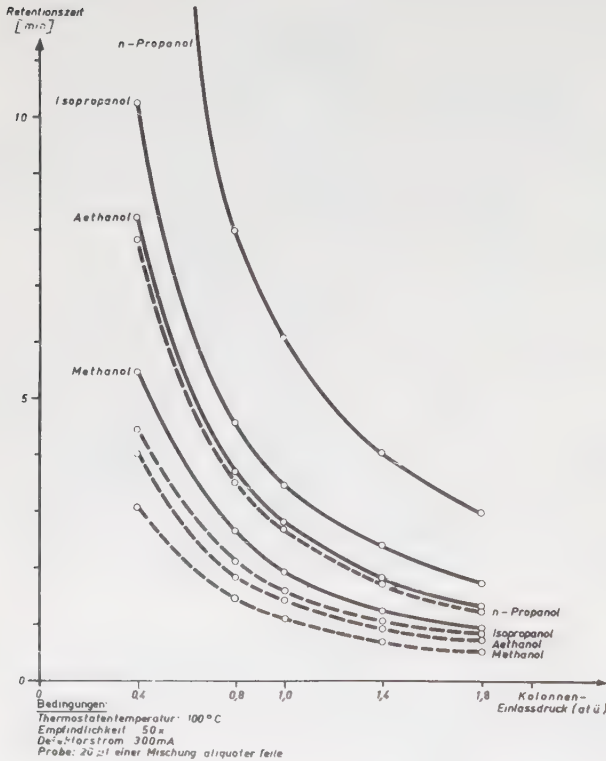
Wie aus Graphik 2 ersichtlich ist, fallen die t_R bei 100° C und 130° C bei steigendem Säuleneinlaßdruck und steigender f_c zunächst schnell, von einer f_c entsprechend einem Einlaßdruck von 1 atü an, folgt ein wesentlich flacherer Verlauf. Zu große f_c -Werte bewirken keine wesentlichen t_R -Verkürzungen mehr. Deshalb wurde bei den späteren Versuchen bei kürzeren Säulen auch mit einer f_c entspr. 0,8 - 1 atü Kolonneneinlaßdruck und bei längeren Säulen mit Drucken von 1 bis 1,5 atü gearbeitet, um die Trennleistung der Säulen nicht zu vermindern.

Aus Graphik 2 kann ferner entnommen werden, wie beträchtlich die Verkürzung der Retentionswerte durch die Temperaturerhöhung ist. Die Kurve für Isopropanol bei 130° C liegt noch unter der für Methanol bei 100° C.

Eine Erhöhung des Schleppgasdruckes um das 4,5-fache und eine gleichzeitige Steigerung der Kolonnentemperatur von 100° C auf 130° C, bewirkt eine Verkürzung der t_R für Aethanol von 8'15" auf 45", also eine Verkürzung der Analysenzeit auf ein Elftel.

GRAPHIK 2

Abhängigkeit der Analysenzeit
vom Kolonneneinlassdruck
bei 100°C ————— bei 130°C

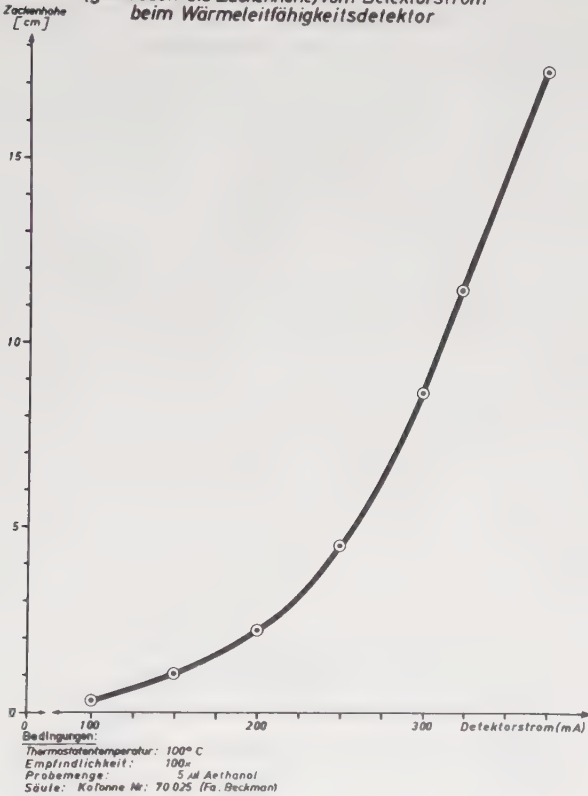


II,3) Abhängigkeit der Zackenhöhe vom Detektorstrom.

Die Anzeigeempfindlichkeit der Detektorzelle kann durch vorschaltbare Widerstände variiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Variation der Sensibilität liegt in der Änderung des Meßzellenstromes, d.h. der Heizung der Wolframdrähte. Während der Anstieg der Empfindlichkeit bei den Vorschaltwiderständen linear vor sich geht, eine Veränderung der Empfindlichkeitsstufe 10 auf die Stufe 1 eine Vergrößerung der Zackenhöhe um das 10-fache bedeutet, ist der An-

GRAPHIK 3

Abhängigkeit der relativen Empfindlichkeit
(gemessen als Zackenhöhe) vom Detektorstrom
beim Wärmeleitfähigkeitsdetektor



stieg bei der Verstärkung des Meßzellenstromes wesentlich steiler, da die Empfindlichkeit der Meßzelle eine Funktion der dritten Potenz des Heizstromes darstellt (KAISER, 1):

$$E = f (i^3).$$

Die graphische Darstellung dieser Relation ergibt eine Kurve mit ziemlich starkem Anstieg (Graphik 3). Aus ihr ist zu entnehmen, daß eine Verdoppelung der Stärke des Heizstromes von 190 auf 380 mA eine Vergrößerung der Zackenhöhe für Aethanol von 1,85 cm auf 17,6 cm, also rd. um das 9½-fache ergibt.

II,4) Abhängigkeit der Zackenhöhe und Zackenfläche von der Geschwindigkeit des Trägergasflusses und der Temperatur

Über den Einfluß der f_c und der Temperatur auf Höhe und Fläche des Zacken liegen verschiedene Literaturangaben vor.

VAN DE CRAATS (31) berichtet, daß die Zackenflächen mit wachsender f_c absinken, während die Zackenhöhe zunächst stark abfällt, dann leicht wieder ansteigt, um dann in einen flacheren Abfall überzugehen. Nach JOHNS (20) fällt die Zackenfläche mit steigender f_c linear ab, während die Zackenhöhe in Form einer Hyperbel abnimmt. Bei steigender Temperatur nimmt die Zackenhöhe gradlinig zu, während die Zackenfläche konstant bleibt. Nach VAUGHAN (22) schließlich geht die Zackenhöhe mit steigender Temperatur durch ein Maximum, während die Zackenfläche abfällt. Die Zackenfläche ist umgekehrt proportional zur f_c , während die Zackenhöhe bei steigender f_c nur unwesentlich absinkt. Die beschriebenen Relationen scheinen z.T. abhängig von der chemischen Natur der Substanzen zu sein eine große Rolle spielt die Retentionszeit (OSTER, 34).

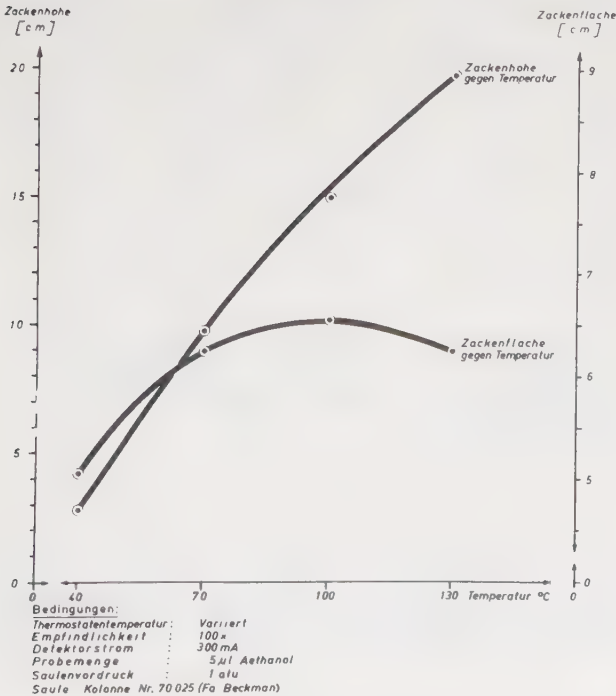
Da die Literaturangaben widersprüchlich waren, wurden eigene Untersuchungen angestellt. Als Testsubstanz diente Aethanol, die Versuchstemperatur betrug 100°C . Zunächst wurden jeweils 5 μl Aethanol bei gleicher Empfindlichkeit und konstanter f_c injiziert und die Versuchstemperatur variiert. Die Zackenhöhen wurden dem Fraktogramm entnommen, die Zackenflächen aus b und h errechnet (h = Zackenhöhe; b = Breite der Zacke in halber Höhe) und die beiden Parameter in Abhängigkeit von der Versuchstemperatur dargestellt (Graphik 4). Danach wird die Zackenhöhe wesentlich stärker von der Temperatur beeinflusst als die Zackenfläche. Nimmt die Zackenhöhe bei einer Temperatursteigerung von 40°C auf 130°C um das 7,2-fache zu, so variiert die Zackenfläche innerhalb des gleichen Temperaturbereiches nur um rd. ein Viertel. Außerdem fällt auf, daß die Zackenhöhe einen nahezu linearen Anstieg nimmt, während

die Zackenfläche durch ein Maximum geht.

Bei einer zweiten Versuchsreihe wurde bei sonst gleichen Bedingungen und konstanter Temperatur der f_c variiert. Wie aus der Graphik 5 hervorgeht, fällt die Zackenhöhe bei wachsendem f_c erst langsam, dann rascher ab. Die Zackenfläche dagegen fällt bei steigendem f_c in Form einer Parabel ab. Be-

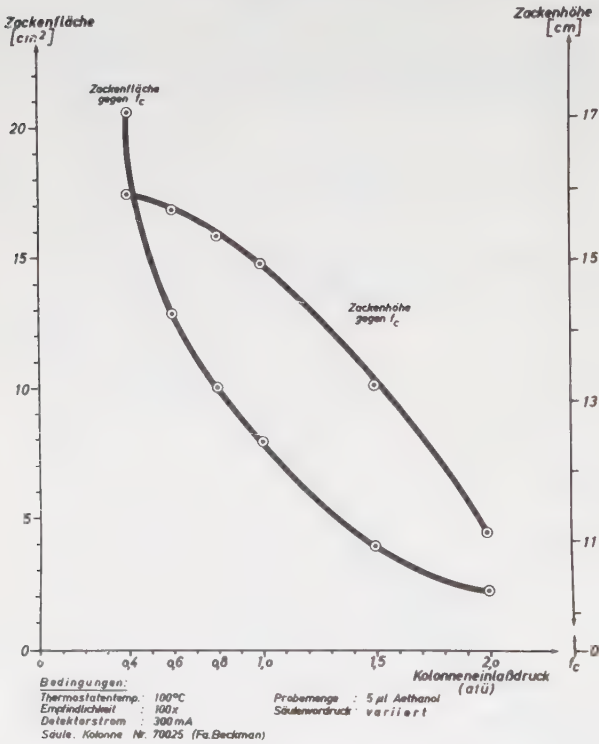
GRAPHIK 4

Abhängigkeit der Zackenhöhe und Zackenfläche
von der Temperatur



GRAPHIK 5

Abhängigkeit der Zackenfläche und Zackenhöhe vom Kolonneneinlaßdruck



trachtet man den gemeinsamen Einfluß der beiden Variablen, so wird deutlich, daß man die Zackenhöhe steigern kann, wenn man die Temperatur anwachsen läßt und die f_c niedrig hält. Dies ist vor allem für die Steigerung der Nachweismöglichkeit wichtig.

Für die maximale Zackenfläche gibt es eine optimale Temperatur, die aus den entsprechenden graphischen Darstellungen

extrapoliert werden kann. Will man eine möglichst große Zackenfläche erreichen, so gilt es auch hier: die f_c klein zu halten. Wie aus der Aufstellung der Retentionszeiten in den Tab. 2 und 2a hervorgeht, bewirkt eine niedrige f_c jedoch eine starke Verlängerung der Analysenzeit. Die Forderung nach hoher Temperatur mit den Vorteilen schärferer Zacken und höherer Nachweisgrenze läßt sich ebenfalls häufig nicht realisieren, da bei steigender Temperatur das Trennvermögen der Säule absinkt. Somit sind Kompromisse bei der Wahl der Parameter nötig, die ein geschicktes Experimentieren verlangen.

III,A) Die gaschromatographische Bestimmung des Blutalkohols nach dem Ausschüttelungsverfahren.

Eines der wenigen Verfahren zur routinemäßigen Bestimmung des Blutalkohols, die zu Beginn der Versuche bekannt waren, war das von JOHNS und CADMAN (15). Über diese Methode und ihre Ausdehnung auf die Atemalkoholbestimmung berichteten auch RAUDONAT (42) und JANITZKI (43).

Das Prinzip der Methode besteht darin, den Aethanol durch Ausschütteln mit n-Propylacetat aus dem Blut zu extrahieren. Durch Schütteln mit trockenem Kaliumkarbonat wird das Gemisch vom Wasser befreit, und anschließend zentrifugiert. Ein bestimmtes Volumen der Aethanol-Propylacetatmischung wird sodann mit der Beckman-Mikrospritze in den Apparat gegeben und der Aethanol mit Hilfe der Kolonne Nr. 70025 Fa. Beckman (Alkoholkolonne) abgetrennt. Als quantitatives Maß gilt die Höhe der Aethanolzacke, für die in Abhängigkeit von der Konzentration im Serum eine Eichkurve erstellt werden muß.

Dieses Verfahren sollte auf seine Anwendbarkeit in der forensisch-toxikologischen Analyse zunächst überprüft werden.

III.A,1) Vorversuche.

Zunächst wurde die Charakteristik der für das Verfahren angegebenen Kolonne Nr. 70025 (Fa. Beckman) untersucht. Dazu wurden Mischungen verschiedener Substanzen injiziert. Ein besonders gutes Trennvermögen besaß die Säule für die unteren aliphatischen Alkohole, während das Wasserrückhaltevermögen äußerst gering war. (Chromatogr.1) ⁺).

Um einen Überblick über die Empfindlichkeit der Methode zu erhalten, wurde die Nachweisgrenze für einige aliphatische Alkohole bei optimalen Versuchsbedingungen und maximaler Ausnutzung des Detektors (400 mA), sowie für einen Detektorstrom von 300 mA bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3

⁺) Die Abbildungen aller Chromatogramme befinden sich im Anhang am Schluß der Arbeit.

Tabelle 3

Nachweisgrenze in gamma
bei Detektorstrom

Substanz	300 mA	400 mA
Methanol	0.35	0.15
Aethanol		
Isopropanol	0.45	0.2
n-Propanol	0.55	0.25
sek.-Butanol	0.65	0.28
iso-Butanol	0.75	0.35
n-Butanol	2,5	1
iso - Amylol	6.0	2.5

Bedingungen:

Thermostatentemp. 100° C

Säule: Beckman Nr. 70025 (Alkohol-Kol.)

Empfindlichkeit: 1 x

fc: 0,85 atü.

zusammengefaßt.

Sodann wurde das gelieferte n-Propylacetat gaschromatographisch auf Reinheit geprüft. Dabei erwies sich, daß das als "reinst" gelieferte Propylacetat aus nicht weniger als 10 Substanzen bestand. Über starke Verunreinigungen im handelsüblichen Propylacetat berichteten auch OSTERHAUS und JOHANNSMEYER (41).

Zwei der Substanzen, die in geringerer Konzentration vorhanden waren, lagen im Fraktogramm auf der Höhe des Aethanol-peaks. Zwar wäre durch die Aufstellung einer Eichkurve dieser Fehler eliminiert worden, gleichzeitig jedoch eine Abhängigkeit der Eichkurve von der Zusammensetzung des gelieferten Propylacetats aufgetreten. Deshalb wurde das Propyl-

acetat durch fraktionierte Destillation gereinigt.

Um einen Vergleichswert für das Ausschüttelungsverfahren zu erhalten, wurde die Reproduzierbarkeit einer gaschromatographischen Analyse bei konstanten Versuchsbedingungen überprüft. Dazu wurde eine ca. 3%ige Lösung von Aethanol insgesamt 40mal injiziert. Die dreifache quadratische Abweichung 3σ betrug

$$3\sigma \pm 0,094\% \text{ entsprechend } \pm 3,12\%.$$

III.A,2) Eichkurven für das Verfahren.

Um den Unterschied zwischen den Ausschüttelungen aus wässriger Phase und aus Serum zu überprüfen, wurden 2 Eichkurven erstellt. Für die erste Eichkurve wurden 500 mg Alkohol abs. mit aethanolfreiem Humanblut in einem Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt. Durch Verdünnung dieser Stammlösung wurden dann die entsprechenden Konzentrationen hergestellt. 1 ml des aethanolhaltigen Blutes und 1 ml n-Propylacetat wurden in einem Zentrifugengläschen mit Schliff eine Minute kräftig geschüttelt, 0,7 g getrocknetes Kaliumkarbonat hinzugegeben, noch einmal eine Minute kräftig geschüttelt und das Gemisch fünf Minuten bei ca. 2000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Diese Versuchsverhältnisse stellen etwas abgewandelte Bedingungen der Vorschrift dar. Es hatte sich bei Vorversuchen herausgestellt, daß 1 g Kaliumkarbonat mit je 1 ml Blut und Propylacetat wie es DIETZE (15) vorschreibt, einen dicken Brei ergab, der nur unter großen Schwierigkeiten ausschüttelbar war. Ferner ergab sich nach dem Zentrifugieren eine schlechte Trennung der Phasen, d.h. eine geringe Ausbeute an aethanolbeladenem Propylacetat. Außerdem zeigte sich, daß ein günstigerer Ausschüttelungseffekt entstand, wenn erst das Blut mit dem Propylacetat ausgeschüttelt wurde und dann erst zur Trocknung das Kaliumkarbonat zugesetzt wurde. Da auch der vorgeschlagene Kolonnenvordruck von 0,6 atü längere

Analysenzeiten ergab, wurde der Säulenvordruck auf 0,8 atü erhöht.

Das Zentrifugat wurde dekantiert und die organische Phase in ein kleines Schliffgefäß getan. Die Probenmenge betrug 40 µl. Die aus den Chromatogrammen entnommenen Zackenhöhen wurden gegen die Konzentration an Aethanol aufgetragen. (Graphik 6, Tab. 4).

Tabelle 4

Gehalt in 0/100	mittl. Peakhöhe (cm)
6.5	2.66
1.0	5.65
1.25	6.55
1.5	8.8
2.0	10.83
2.25	12.56
2.5	14.45
3.0	16.8
3.5	7.6
4.0	9.3
4.5	10.8
5.0	12.85

Tabelle 5

Gehalt in 0/100	mittl. Peakhöhe (cm)
0.8	6.2
1.0	7.33
1.1	8.25
1.2	9.65
1.4	11.2
1.6	12.7
1.7	12.8
1.8	13.9
2.0	15.33
3.0	22.8

Empfindlichkeit: 0 - 3⁰/100: 2 x
3 - 5⁰/100: 5 x

fc: 0,8 atü

Thermostatentemp.: 100°C

Detektorstrom: 300 mA

Säule: Beckman Nr. 70025 (Alkohol-Kol.)

Schleppgas: H₂

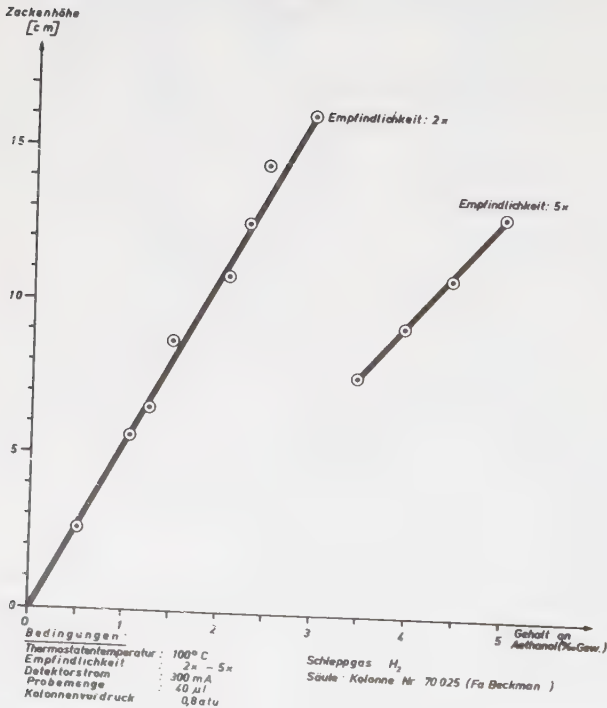
Probemenge: 40 µl

Die zweite Eichkurve wurde mit Alkoholtestlösungen (Fa. Merck) angefertigt. Sie sollte gleichzeitig dazu dienen, die Konstan

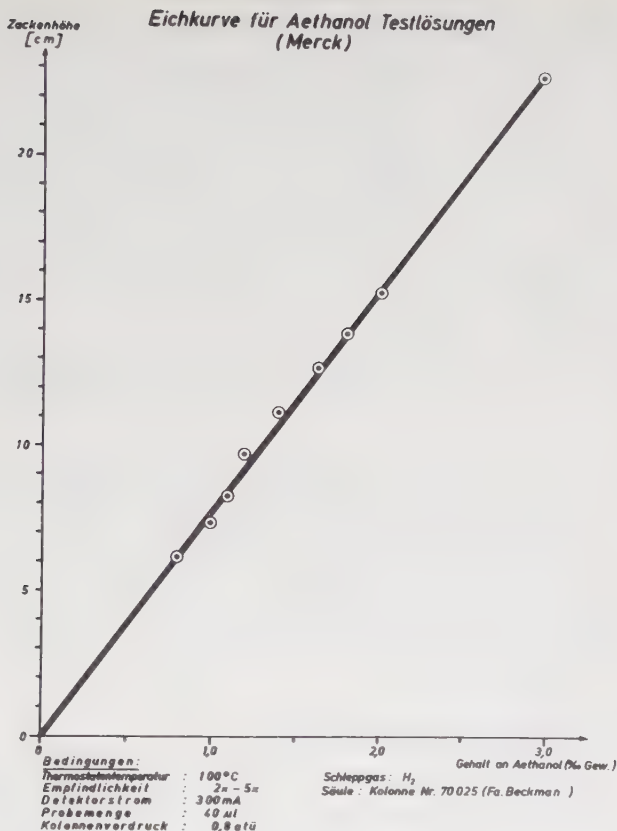
der Versuchsparameter zu überwachen. Es wurden je 1 ml Testlösung und n-Propylacetat eine Min. lang kräftig geschüttelt und wegen der größeren Menge flüssiger Phase hier 1 g getrocknetes Kaliumkarbonat zugesetzt. Die übrigen Versuchsbedingungen waren die gleichen (Tab.5, Graphik 7).

GRAPHIK 6

**Alkohol - Eichkurve
(Serum)**



GRAPHIK 7



Wie ein Blick auf die beiden Eichkurven zeigt, streuen die Werte trotz mehrfacher Bestimmung ziemlich stark; die Streuungen sind jedoch in beiden Kurven etwa gleich. Dies kann auf die unvermeidlichen Pipettierfehler und auf eine ungleichmässige Gleichgewichtseinstellung zwischen wässriger und organischer Phase bei nur einmaligem Ausschütteln zurückgeführt werden. Ferner liegen die Werte für Alkoholtestlösungen durchweg höher als die entsprechenden für Serum, ein Zeichen dafür, daß aus wässriger Phase mehr Alkohol extrahiert wird.

III.A,3) Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens wurde der Aethanolgehalt eines Blutes mehrfach bestimmt. Es handelte sich um ein Blut mit 1,9 ‰ Aethanol, das 20mal ausgeschüttelt wurde. Die dreifache mittlere Abweichung betrug $1,9 ‰ \pm 0,12 ‰$ entspr. $\pm 6,33 ‰$. Sie war also doppelt so hoch wie der auf S. 20 ermittelte Wert. Die Variationsbreite betrug - 0,20 ‰ bis + 0,25 ‰. Das Ausschüttelungsverfahren erfaßte also die tatsächlichen Alkoholwerte nur mit unzureichender Genauigkeit.

Verschiedene Blute, die bereits nach dem Widmark- und ADH-Verfahren bestimmt worden waren, wurden auch gaschromatographisch untersucht.

Eine genaue statistische Auswertung wurde nicht vorgenommen, so daß die Übereinstimmung nur grob beurteilt werden kann. Als gute Übereinstimmung wurde eine Abweichung unter $\pm 5 ‰$, als mäßige eine Abweichung unter $\pm 7,5 ‰$ bezeichnet. Die gaschromatographisch ermittelten Werte stimmten mit den mit Hilfe des Widmark- und ADH-Verfahrens gewonnenen Werten nur in ca. 50 ‰ der Fälle gut überein.

III.A,4) Diskussion der Ergebnisse.

Obwohl die Ergebnisse an einem relativ kleinen Untersuchungsmaterial gewonnen wurden, kann gesagt werden, daß das Ausschüttelungsverfahren zu stark streuende Ergebnisse liefert und außerdem eine Reihe von Nachteilen, wie doppelter Pipettenfehler und leichte Flüchtigkeit des Propylacetats hat. - Es bringt auch zeitlich keinen Vorteil gegenüber den bisherigen Verfahren, da das Ausschütteln der Blute und das Ausspülen der schweren Komponenten des Propylacetats aus der Kolonne zeitraubend und umständlich ist. - Es ist fraglich, ob sich jedesmal der gleiche Verteilungskoeffizient zwischen wäßriger und organischer Phase einstellt; ein Fehler, den man

sonst durch mehrmaliges Ausschütteln beseitigt, was hier jedoch nicht möglich ist. - Außerdem ist es zeitraubend und nur unter großen Substanzverlusten möglich, das verwendete relativ teure Propylacetat zu rektifizieren. - Die breiten Zacken der Komponenten des Propylacetats überdecken auch die Zacken anderer flüchtiger Substanzen. Dadurch wird eine gleichzeitige Anwendung des Verfahrens zur gleichzeitigen Analyse anderer flüchtiger Substanzen in biologischem Material stark eingeschränkt. - Ein Vorteil des Verfahrens liegt in seiner Spezifität, die auch in anderem Zusammenhang bestätigt werden konnte. Deshalb wurde die Kolonne Nr. 70025 (Fa. Beckman) für die Entwicklung eines Routineverfahrens noch einmal herangezogen (s. Abschn. V.E.).

III.B) Versuche zur Entwicklung eines neuen Verfahrens.

Es sollte eine neue Methode ausgearbeitet werden, die das Ausschütteln von Blut und anderem biologischen Material umgeht. Da die Kolonne Nr. 70025 (Fa. Beckman) nicht in der Lage war, wäßrige Proben aufzutrennen, wurde versucht, das Wasser durch ein Trockenmittel aus dem Analysenmaterial zu entfernen. Durch Erwärmen in einem geschlossenen System sollte dann der Aethanol oder andere flüchtige Substanzen in die überstehende Atmosphäre getrieben werden. Nach Einstellung des Gleichgewichtes zwischen der Alkoholkonzentration in der Flüssigkeit und Luft sollte dann die mit der flüchtigen Substanz beladene Luft direkt in den Gaschromatographen eingespritzt werden.

III.B,1) Wahl des Trockenmittels und geeigneter Reaktionsgefäße.

Das Trockenmittel mußte in der Lage sein, in ausreichendem Maße Wasser zu binden und sollte chemisch neutral und temperaturbeständig sein. Es durfte ferner keine Adsorption des

Alkohols zeigen, und die Reaktion mit Wasser sollte nicht zu stark exotherm sein.

In der Literatur finden sich im Zusammenhang mit der Gaschromatographie nur spärliche Hinweise. MAHAL (16) sowie FAGERSON und NAWAR (17) benutzten Kaliumkarbonat und erwähnen seine geringe Adsorptionskraft. FARINGTON (18) überprüfte im Zusammenhang mit seinen Analysen verunreinigter Luft ebenfalls verschiedene Trockenmittel und wies auf ihre unterschiedliche Adsorptionskraft gegen verschiedene Substanzen hin.

Zunächst wurde Diphosphorpentoxyd (P_2O_5) überprüft. Vorproben zeigten jedoch die viel zu heftige exotherme Reaktion mit Wasser. Danach wurden Aluminiumoxyd (Al_2O_3), Calciumchlorid ($CaCl_2$), Silicagel und Kaliumkarbonat (K_2CO_3) herangezogen. Mit diesen Substanzen wurden zunächst Adsorptionsversuche mit Aethanol vorgenommen. Dazu wurden je 1 g des Trockenmittels mit 5 μ l Aethanol in ein Röhrchen gegeben, daß mit einer Serumkappe verschlossen war. Das Röhrchen wurde 15 Min. bei $100^\circ C$ temperiert, danach während einer halben Stunde auf Zimmertemperatur abgekühlt und aus dem Röhrchen 5 ml der aethanolhaltigen Luft mit einer Injektionspritze aufgezogen und in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Peakhöhe von 5 μ l Aethanol im gleichen Röhrchen ohne Trockenmittel wurde gleich 100% gesetzt. Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich ist, adsorbierten Aluminiumoxyd und Kieselgel die angewendete Aethanolmenge vollständig, waren also als Trockenmittel ungeeignet. Kaliumkarbonat zeigte die geringste Adsorption, jedoch waren die Trocknungseigenschaften gering.

Ogleich die Adsorptionsfähigkeit des Calciumchlorids beträchtlich war, wurde es dennoch verwendet, da es als einzige Substanz genügend Wasser binden konnte. Außerdem war zu erwarten, daß die Adsorption gegenüber Aethanol bei gleich-

zeitiger Anwesenheit von Wasser geringer sein würde, da vornehmlich das Wasser die Oberfläche besetzen würde.

Tabelle 5

Substanz	mittlere Zackenhöhe in (cm)	entspricht relativer Adsorption in %
Al_2O_3	0,02	99,9 %
Kieselgel	0	100 %
K_2CO_3	22,2	1,5 %
CaCl_2	3,7	68 %

Bedingungen:

Säule: Beckman 70025 (Alkoholkol.)

Thermostatentemp.: 100°C

Empfindlichkeit: 1 x

Detektorstrom: 350 mA

fc: 0,8 atü

Trägergas: H_2

Für die Vorproben wurden verschiedene Glasgefäße benutzt. Zunächst wurden kleine ca. 15 ml fassende Erlenmeyer-Kölbchen mit Serumkappenverschluß verwendet, aus denen die aethanolhaltige Luft unter Druckausgleich mit Hilfe einer zweiten eingestochenen Kanüle entnommen wurde. Da die Ergebnisse schlecht reproduzierbar waren, wurden Glasröhrchen benutzt, deren verjüngtes Ende mit einem Gummischlauch und einer Klemme verschlossen waren, so daß die Ausgleichsluft von unten her durch das Untersuchungsmaterial strömen konnte. Schließlich wurde eine kleine Apparatur konstruiert, die aus einem kleinen Kölbchen mit seitlichem Stutzen für den Gummverschluß sowie einem Schliffaufsatz aus einer abgesägten Injektionsspritze mit gezogenem besonders dichtem Kolben bestand. Wurde ein bestimmtes Volumen mit einer zweiten Injek-

tionsspritze nach Durchstechen der Serumkappe entnommen, so wurde im gleichen Maße der Kolben der Ausgleichsspritze nach unten bewegt. Mit dieser kleinen Apparatur wurden die besten Ergebnisse erzielt.

III.B,2) Menge des Trockenmittels und Temperaturbedingungen.

Zur Bestimmung der benötigten Menge des Trockenmittels wurden sowohl wäßrige Aethanollösungen als auch aethanolhaltige Seren verwendet. Für wäßrige Lösungen war die benötigte Menge an Trockenmittel etwa um 20% größer als für Serum. 1,7 g Calciumchlorid pro ml Serum erwies sich als zu wenig, da sich nach dem Abkühlen noch Kondenswasser an den Wänden der Apparatur befand. Jede größere Wasserdampfkonzentration bewirkte eine deutliche Senkung der Peakhöhe, da sich beim Abkühlen immer ein Teil des Aethanols mitkondensierte. Als Optimum wurden für 1 ml Serum 2,2 g CaCl_2 gefunden; die Mischung lag dann während des Temperierens als hochviskose Lösung vor. So konnte sich am besten ein Gleichgewicht zwischen der gesättigten Lösung und der Dampfphase einstellen. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur erstarrte die Mischung kristallin. Eine höhere Menge Calciumchlorid war nicht ratsam, da ein Überschuß die Ergebnisse durch Adsorption verschlechterte.

Die Mischung des Serums mit dem Trockenmittel mußte recht hoch temperiert werden, um möglichst viel Alkohol in die darüber befindliche Luft zu treiben. Eine Temperatur von 80°C erwies sich als unzureichend. Optimale Zackenhöhen ergaben sich durch ein Temperieren von 10 Minuten bei 100°C . Eine weitere Steigerung der Temperatur auf 120°C war ungünstig, weil dann der in der Apparatur auftretende Druck zu groß wurde und die Gefahr des Entweichens von Alkoholdämpfen bestand. Als Abkühlzeit auf Zimmertemperatur erwiesen sich 20 - 25 Minuten als ausreichend, da sich dann die Zackenhöhen der eingespritzten Proben nicht mehr verkleinerten.

Besonders deutlich war die Abhängigkeit der Zackenhöhe von der Temperatur der alkoholhaltigen Luft. Dies zeigte sich bei der Dosierung der aethanolbeladenen Luft in den Gaschromatographen vor dem völligen Erkalten der Kölbchen. Chromatogr. 2 zeigt die gleichmässige Abnahme der Zackenhöhe bei einer stufenweisen Verminderung der Einspritztemperatur von 100°C über 80°C und 50°C auf Zimmertemperatur.

Da bei den Versuchen stets gegen einen Überdruck des Schleppgases von 1,4 atü eingespritzt wurde, konnten Fehler durch Undichtheiten der verwendeten Injektionsspritzen entstehen. Dadurch wären bei der Injektion unkontrollierbare Mengen Alkohol verloren gegangen.

Um dies zu prüfen wurden aus 6 Röhrchen je 5 mal Proben entnommen und einmal gegen 0,2 atü, das andere Mal gegen 1,4 atü eingespritzt. Aus den Mittelwerten der Zackenhöhen bei 0,2 atü und bei 1,4 atü ergab sich trotz der Streuung der Einzelergebnisse, daß eine wesentliche Beeinflussung der Analyseergebnisse durch die Höhe des Druckes, gegen den die Probe eingeführt wurde, nicht auftrat.

Mit den so erarbeiteten Versuchsbedingungen wurden Ergebnisse erzielt, deren Reproduzierbarkeit jedoch noch nicht ausreichte. Dies lag vor allem an den mangelhaften Reaktionsgefässen und an der Spritze. Eine Verbesserung der Genauigkeit wäre durch Verwendung des Gasprobenventils möglich gewesen (Reproduzierbarkeit nach Firmenangaben $\pm 0,1\%$), für dessen Evaluierung jedoch keine geeignete Pumpe zur Verfügung stand. Außerdem war die Detektion der sehr geringen, in 5 ml Luft enthaltenen Alkoholmengen nur bei maximaler Belastung des Detektors möglich. Namentlich bei einem Routineverfahren wäre jedoch eine ständige maximale Belastung des Detektors für dessen Lebensdauer sehr nachteilig gewesen. Da der Flammenionisationsdetektor (FID) noch nicht zur Verfügung stand,

mußten die durchaus erfolgversprechenden Versuche zunächst abgebrochen werden.

Vor der Wiederaufnahme der Untersuchungen mit dem FID erhielten wir Kenntnis von der Weiterentwicklung dieses Verfahrens durch MACHATA (137).

IV.) Gasreaktionschromatographie (GRC).

Auch dieses spezielle Verfahren der gaschromatographischen Analyse wurde auf seine Brauchbarkeit für die Bestimmung von Alkoholen in wäßriger Lösung überprüft. Es war jedoch nicht das Ziel der Arbeit, die Alkohole durch chem. Reaktionen in andere Substanzen umzuwandeln, sondern es sollte lediglich versucht werden, das Wasser zu eliminieren.

Über die Gasreaktionschromatographie liegt bereits eine umfangreiche Literatur vor. ZLATKIS u. ORO (44, 49) reduzierten Aminosäuren zu den betreffenden Aldehyden in einem Mikroreaktor und entfernten die geringen Wassermengen mit Hilfe einer Trockenkolonne. BAYER (45) bestimmte kleine Mengen von Wasser nach Reaktion mit Calciumhydrid als Acetylen. DUSWALT und BRANDT (46) eliminierten bei ihren Elementaranalysen das Reaktionswasser ebenfalls in einem Rohr mit Calciumhydrid. SINGLIAR (47) verwendete gleichfalls eine 2 cm lange Vorkolonne mit dieser Substanz zur Eliminierung geringer Mengen Wasser. KUNG (48) setzte eine unabhängig beheizte Vorkolonne mit Calciumhydrid ein. Bis zu Wasserkonzentrationen von 36% erzielte er gut reproduzierbare Ergebnisse. Die umfangreichsten Versuche mit der Gasreaktionschromatographie haben DRAWERT und Mitarbeiter (50, 51) unternommen. Sie wandelten Alkohole in Ester der salpetrigen Säure, Grenzkohlenwasserstoffe und Olefine um und entfernten das injizierte und das gebildete Wasser mit Hilfe einer Calciumhydrid-Kolonne. Sie bestimmten auch den Aethanol im Serum nach Überführung in Aethylen. Über negative Erfahrungen mit CaH_2 als wasserbindendem Mittel berichtete dagegen MACHATA (54).

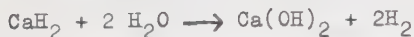
Den zitierten Verfahren ist gemeinsam, daß sie entweder nur für Wassergehalte brauchbar sind, die etwa den Gehalten der zu analysierenden Substanzen entsprechen, oder daß die entsprechenden Substanzen nach Umwandlung in gasförmige Stoffe abgetrennt werden. Es war bisher jedoch noch nicht versucht

worden, auch bei großem Wasserüberschuß und ohne vorherige chemische Umwandlung des Aethanols Alkoholbestimmungen durchzuführen.

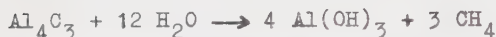
IV.1) Wahl der wasserentziehenden Stoffe und Vorversuche.

Zur Entfernung des Wassers wurden Aluminiumcarbid (Al_4C_3) und Calciumhydrid (CaH_2) benutzt. Diphosphorpentoxyd (P_2O_5) erwies sich bereits in Vorversuchen als ungeeignet, da die Reaktion zu stark exotherm verlief und ferner Phosphorsäure-ester entstanden.

Die Formeln für die stöchiometrische Umsetzung lauten:



10 μl H_2O entsprechen 11,6 mg CaH_2 und 12,4 ml H_2



10 μl H_2O entsprechen 6,66 mg Al_4C_3 und 4,8 ml CH_4 .

Im Reagenzglasversuch erwies sich CaH_2 als die reaktionsfreudigere Substanz, die Umsetzung mit Wasser verlief schon bei Zimmertemperatur sehr kräftig, während Al_4C_3 erst bei leichtem Erwärmen auf 40°C in wäßriger Anschüttelung eine kräftige Gasentwicklung zeigte. Außerdem hatte CaH_2 den Vorteil, daß sich bei der Reaktion H_2 (also Trägergas) bildete, während aus Al_4C_3 Methan entstand, das als Zacke auftrat. Störend war bei CaH_2 lediglich, daß es pro Mol Wasser 1 Mol H_2 entwickelte. Für Proben von 10 μl H_2O sind dies 12,4 ccm H_2 . Aus der gleichen Menge H_2O setzt Al_4C_3 nur 4,8 ml Methan frei. Außerdem verbrauchen 10 μl H_2O 11,6 mg CaH_2 , während von Al_4C_3 nur 6,66 mg benötigt werden. Diese Zahlen gelten natürlich nur bei quantitativem Verlauf.

Die beiden Substanzen wurden zunächst durch Übergießen mit Säure auf Kohlendioxyd, Schwefelwasserstoff und Phosphor-

wasserstoff überprüft. Da bei beiden Substanzen kein entsprechender Geruch auftrat bzw. kein CO_2 freigesetzt wurde, konnte darauf geschlossen werden, daß Verunreinigungen durch diese Stoffe zumindest nur in sehr kleinen Mengen vorlagen.

Zur Voruntersuchung auf Adsorption wurden je 0,5 g - 2 g der beiden Substanzen zusammen mit 5 μl Aethanol in die unter Abschnitt II.B 1) beschriebenen Reaktionsgefäße gegeben. Nach dem Temperieren bei 100°C (Dauer: 10 Min.) und einer halben Stunde Abkühlzeit wurden wieder 5 μl der überstehenden Luft aufgezogen und eingespritzt. Die Höhe der Zacken wurde mit Leerwerten ohne die wasserentziehenden Substanzen verglichen. Wenn auch keine genau übereinstimmenden Werte erhalten wurden, so konnte doch gefolgert werden, daß rund 15% des Äthanol adsorbiert blieben. Wie weit bei einer Temperatur von 100°C in einer Säule wieder eine partielle Desorption auftrat, sollten spätere Versuche zeigen.

Um Aussagen über die Stärke und Geschwindigkeit der Reaktion zu gewinnen, wurde eine kleine Glasapparatur hergestellt, um die ablaufende Umsetzung auch visuell verfolgen zu können. Sie bestand aus einem U-Rohr, das mit einer H_2 -Bombe mit Reduzierventil verbunden war. Die Verbindung bestand aus einem Gummischlauch, durch den direkt eingespritzt werden konnte. Die Proben wurden auf Filtrierpapier injiziert, um eine möglichst große Verdampfungsfläche zu erzielen. Das U-Rohr wurde mit CaH_2 bzw. Al_4C_3 oder Mischungen dieser Substanzen gefüllt. Das U-Rohr tauchte in ein beheiztes Paraffinbad. Der ableitende Schenkel des U-Rohres war mit einem kleinen Calciumchlorid-Röhrchen durch einen leicht abnehmbaren Glasschliff verbunden. Das hintere Ende dieses Röhrchens führte zu einer Waschflasche als Blasen-zähler, daran konnte noch eine pneumatische Wanne zur exakten Messung des Durchflusses angeschlossen werden.

Das U-Röhrchen wurde sodann mit jeweils 2g CaH_2 bzw. Al_4C_3

gefüllt, der H_2 -Durchfluß eingestellt und in zeitlichen Abständen von ca. 20 Sekunden Proben von 20 μ l Wasser injiziert. Dabei konnte im Blasenprüfer beobachtet werden, daß sich nach jeder Injektion der Durchfluß des Wasserstoffs verlangsamte, bis er schließlich nach der 5. - 7. Injektion fast völlig zum Erliegen kam. Die entstandenen Reaktionsprodukte verlegten den Querschnitt des U-Röhrchens derart, daß der Durchfluß fast vollständig unterbrochen wurde. Zur Reinigung mußte das Röhrchen mit einer starken Stahlnadel ausgekratzt werden. Der Vorversuch zeigte, daß die beiden Substanzen nicht in reiner Form verwendet werden konnten und daß eine inerte Substanz erforderlich war, die das Verkleben der Reaktionsprodukte verminderte. Hierzu wurde zunächst Sterchamol benutzt.

Bei quantitativer Umsetzung werden für 10 μ l Wasser 7 mg Al_4C_3 oder rund 11 mg CaH_2 zur Bindung benötigt. Es war die Frage, ob bei der Vermischung dieser Mengen mit Sterchamol im U-Röhrchen die Reaktion quantitativ ablief. Um dies zu prüfen wurden 180 mg CaH_2 bzw. 110 mg Al_4C_3 mit 3g Sterchamol gemischt und in Anteilen von 10 μ l insgesamt 150 μ l Wasser injiziert (stöchiometrische Menge). Dabei zeigte sich, daß bereits nach 3 - 4 Injektionen Wasser in das $CaCl_2$ -Röhrchen übertrat. Am Schluß des Versuches waren bei Verwendung von Al_4C_3 nur ca. 1/5 des injizierten Wassers gebunden. Daraus konnte geschlossen werden, daß die Vorsäule eine gewisse Länge haben mußte, um eine maximale Bindung von Wasser zu erreichen.

Sodann wurde das U-Rohr mit 850 mg Al_4C_3 gefüllt und 160 μ l Wasser injiziert. Trotz des hohen Überschusses traten 50 mg Wasser in das $CaCl_2$ -Röhrchen über. Wurde ein 4 mal so langes U-Rohr mit der gleichen Menge Al_4C_3 verwendet, so blieben nur 5 mg Wasser ungebunden. Eine bessere Wasserbindung konnte auch erreicht werden, wenn das kurze U-Rohr verwendet wurde und der Anteil des Al_4C_3 um 50% gesteigert wurde. Dann traten nur 11 mg Wasser hindurch.

Die Vorversuche führten zu folgenden Ergebnissen:

Das Zusammenkleben der Substanz nach der Reaktion muß durch Zugabe eines inerten Trägers vermindert werden. Eine Adsorption von Alkohol an der wirksamen Substanz und eventuell auch am inerten Träger ist zu erwarten.

Da der Wasserdampf mit beträchtlicher Geschwindigkeit über das Calciumhydrid bzw. Aluminiumcarbid hinweg strömt, ist die Reaktionszeit offenbar zu kurz und die Umsetzung verläuft nicht quantitativ. Es muß deshalb mit einem beträchtlichen Überschuß des Wasser entziehenden Mittels gearbeitet werden. - Da das Wasserbindungsvermögen des Calciumhydrids beträchtlich größer ist als das von Aluminiumcarbid, sollte vorzugsweise mit CaH_2 gearbeitet werden. - Die Vorsäule mußte eine gewisse Länge haben, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Gleiche Mengen Wasser entziehender Substanz auf einer längeren Säule sind beträchtlich wirksamer als auf einer kürzeren Säule.

IV.2) Wahl des inerten Trägers.

Zunächst mußte eine inerte Substanz gefunden werden, die ein Zusammenkleben verhinderte, chemisch neutral war und keine Adsorptionerscheinungen zeigte.

Bei den Versuchen wurde als Hauptkolonne die Säule Nr.70025 (Fa. Beckman) verwendet, als Vorkolonne diente ein ca. 30 cm langes Kupferrohr mit 6 mm Durchmesser, das jeweils mit einer Mischung von 100 mg Calciumhydrid und 3 g des inerten Trägers gefüllt war. Eine Zumischung von Calciumhydrid war notwendig, um die Versuche mit wäßrigen Proben durchführen zu können. Dessen Menge war jedoch so knapp wie möglich bemessen, um eine eventuell vorhandene Eigenadsorption von Calciumhydrid auszuschalten. Zur Kontrolle der Versuche wurden die gleichen Vorsäulen mit Sterchamol ohne Calciumhydrid gefüllt und die Überprüfung mit Lösungen der Alkohole gleicher Konzentration in organischen Solventien vorgenommen.

Die Thermostatentemperatur betrug 100°C , der Detektorstrom 350 mA, die fc 1,1 atü, die Empfindlichkeit 1 x.

Als Testlösungen dienten eine wäßrige Lösung und eine Lösung der Alkohole in iso-Amylacetat mit je 0,5 % Methanol und Aethanol. Die Probemenge betrug 5 μl .

Es wurden folgende inerte Trägersubstanzen überprüft:

Seesand: Die Alkoholzacken der Testlösung verschwanden zwar nicht vollständig, dennoch war eine mäßige Adsorption zu beobachten und die Reproduzierbarkeit deswegen unzureichend.

Da Kaliumkarbonat in der Lage ist Wasser zu binden, schien es als inerter Träger geeignet. Die Versuche zeigten jedoch, daß es sehr lange dauerte, bis eine konstante Nulllinie eingestellt werden konnte. Auch nach jeder Injektion der wäßrigen Probelösung verging längere Zeit, bis sich die Nullpunkt Konstanz einstellte. Für Routinesanalysen, die wenig Zeit erfordern sollen, ist jedoch die schnelle Wiedereinstellung der Nulllinie eine wichtige Forderung. Die Inkonzanz der Nulllinie war offensichtlich darauf zurück zu führen, daß das Kaliumkarbonat beim Erwärmen zunächst entwässert wurde, sich dann bei jeder Injektion erneut mit Wasser lud, worauf das Wasser nur langsam wieder an den Trägergasstrom abgegeben wurde.

Außerdem war nach Verwendung von Kaliumkarbonat der Inhalt der Vorkolonne besonders fest miteinander verbacken. Wahrscheinlich war aus Calciumoxyd und Kaliumkarbonat eine mörtelartige Masse unter Bildung von Calciumkarbonat entstanden. Der Druckabfall war dadurch auch besonders stark, um die gleichen Retentionszeiten wie am Beginn der Versuche zu erhalten, mußte die fc nach Injektion von 40 μl Wasser auf das Zweieinhalbfache gesteigert werden.

Sterchamol: Während die beiden Alkohole auf der Hauptkolonne

nach Injektion der Probelösung zwei deutlich getrennte Zacken von 2,8 und 2 cm Höhe ergaben, waren sie nach Vorschaltung der mit Sterchamol gefüllten Vorkolonne bei einem großen Teil der Proben völlig verschwunden. Bei anderen Injektionen waren die Zacken der Testlösung zwar vorhanden, jedoch verkleinert und die Trennung fast aufgehoben, d.h. statt zweier scharf getrennter Zacken erschien ein länglicher Berg mit zwei ungleich hohen Gipfeln.

Durch Bedeckung der aktiven Oberfläche konnte die Adsorption eliminiert werden. Nach Imprägnierung von Sterchamol mit 10% Polyglykol war die Adsorption, wie erwartet wurde, verschwunden.

Bei Natriumchlorid waren die geringsten Störungen zu verzeichnen und die Reproduzierbarkeit des Verfahrens gut.

Von den überprüften inerten Substanzen zeigten somit nur Natriumchlorid und imprägniertes Sterchamol ein befriedigendes Ergebnis. Deshalb fanden bei den späteren Versuchen auch nur diese beiden inerten Träger Verwendung.

IV,3) Adsorption von reinem Calciumhydrid und Bestimmung der Mengen für größere Wasserproben.

Zur Feststellung der Adsorption des Calciumhydrids wurden 1,5 g in eine 6 cm lange Vorsäule gefüllt. Nach Injektion der Testlösung war keine totale Adsorption zu beobachten, jedoch schwankten die Zacken beträchtlich in der Höhe. Auch kleine Mengen der unvermischten Alkohole wurden nicht vollständig adsorbiert. - Besonders stark war auch hier die Beeinflussung der fc. Nach Injektion von 300 μ l Wasser, also nachdem ca. 1/4 des Calciumhydrid umgesetzt war, betrug die fc nur noch die Hälfte des Ausgangswertes. Schon dieser starke Einfluß des Calciumhydrid auf einen wichtigen Versuchsparameter, die Geschwindigkeit des Gasflusses, sprach neben der beobach-

teten Adsorptionskraft gegen eine Verwendung in der gaschromatischen Routineanalyse.

Es war ferner zu prüfen, welche Menge an CaH_2 auch größere Proben von Wasser quantitativ eliminierte. Deshalb wurden 900 mg CaH_2 mit 3,5 g Sterchamol (imprägniert mit Polyglykol) vermischt und in eine 45 cm lange Vorkolonne gefüllt. Auch hier erwies sich nach Injektion der Testlösung, daß die Methanol- und Aethanolzacken nur mit Schwankungen von $\pm 20\%$ reproduziert werden konnten. Es wurden auch lediglich 25 μl Wasser quantitativ zurückgehalten, bei größeren Mengen kam es nach 8 Minuten zu einer flachen und niedrigen Wasserzacke. Der Überschuß an CaH_2 mußte also das Dreißigfache der stöchiometrischen Menge betragen. Auch nach einer weiteren Steigerung des CaH_2 -Gehaltes auf 1,7 g u. 3,5 g und einer Verlängerung der Vorsäule auf 70 cm wurden nur Proben von 40 μl Wasser quantitativ eliminiert. Hier reichte also auch ein dreißigfacher Überschuß von CaH_2 nicht mehr aus. Je größer die Proben wurden, desto stärker mußte auch der Überschuß an CaH_2 anwachsen. Bei kleineren Probemengen (5 - 10 μl) war dagegen das Zwanzigfache der stöchiometrischen Menge zur völligen Eliminierung des Wassers ausreichend.

Ferner kam es selbst bei dieser großen Menge an inerten Träger zu einem Verkleben in der Vorsäule, was sich in einem Absinken der Geschwindigkeit des Gasflusses auswirkte. Erschöpfte sich durch fortlaufende Injektion der CaH_2 -Gehalt der Vorsäule immer mehr, so wurden die Zacken in raschem Tempo breiter und die Trennung wurde bedeutend schlechter (Chromatogr. 3 u. 4). Wesentlich stärker als aus organischen Solventien war die Adsorption der Alkohole aus einer wäßrigen Testlösung gleicher Alkoholkonzentration. Dies konnte dadurch erklärt werden, daß das in großem Überschuß vorhandene organische Lösungsmittel den größten Teil der adsorbierenden Oberfläche besetzte, während bei wäßrigen Systemen, infolge der

chemischen Bindung des Wassers, die ganze Oberfläche für die Adsorption der Alkohole zur Verfügung stand.

IV.4) Verminderung der Calciumhydrid-Menge und Verwendung einer Doppelsäule.

Nach den bisherigen Versuchsergebnissen bestand wenig Aussicht, mit Hilfe der Gasreaktionschromatographie das Wasser aus rasch aufeinander folgenden Blutproben zu eliminieren. Dieses Verfahren schien deshalb für Routineanalysen kaum geeignet.

Es sollte aber dennoch geprüft werden, ob sich durch Verminderung der Menge an Calciumhydrid und Verwendung eines geeigneten inerten Trägers die Adsorption durch Änderung der Versuchsparameter so weit vermindern ließ, daß sich das Verfahren wenigstens für Einzelanalysen eignete. Durch Kombination einer Reihe von Vorsäulen mit geringen CaH_2 -Mengen und Verwendung von Hähnen zum Umschalten von einer Vorkolonne auf eine neue wäre evtl. eine ganze Reihe von Analysen hintereinander möglich gewesen, allerdings unter beträchtlichem technischen Aufwand.

Wie die Vorversuche ergeben hatten, mußte mit einem beträchtlichen Überschuß an CaH_2 gearbeitet werden, auch wenn nur 10 μl -Proben verwendet wurden. Deshalb wurden 140 mg CaH_2 mit 3,5 g Sterchamol (imprägniert mit Polyglykol) gemischt und in eine Vorsäule von 45 cm Länge gefüllt. Diese Menge reichte jedoch nicht aus, um 10 μl Wasser zu binden. Erst 240 mg hielten, wie aus den Versuchen zu erwarten war, 10 μl Wasser quantitativ zurück. Es war klar, daß bei derartigen CaH_2 -Mengen Adsorptionen in einem Maße auftreten mußten, welches die Gasreaktionschromatographie auch für Einzeluntersuchungen nicht geeignet erscheinen ließ.

Da das Problem darin bestand, die Mengen an CaH_2 wegen der Adsorption möglichst gering zu halten, wurde nunmehr ver-

sucht, durch Verteilung einer kleinen Menge der Substanz auf eine vor und eine hinter die Hauptkolonne geschaltete Säule eine günstigere Wasserbindung mit kleinsten CaH_2 -Gehalten zu erzielen. Es kamen gleichlange Vor- und Nachsäulen mit je 70 mg CaH_2 zur Anwendung. Damit konnten 20 - 25 μl Wasser quantitativ eliminiert werden. Bei der Injektion der wäßrigen Testlösung zeigten sich jedoch wieder bedeutend schlechtere Auftrennungen. Als Zeichen der Adsorption schwankten die Peakhöhen der einzelnen Substanzen und die Retentionszeiten stiegen mit sinkender Geschwindigkeit des Gasflusses.

Auch durch Variationen der Versuchsbedingungen war keine größere Desorption zu erzielen. Bei einer CaH_2 -Sterchamolvorkolonne wurde zunächst der Druck auf 2,5 atü und sodann die Temperatur auf 130°C und 160°C gesteigert. Trotz dieser extremen Bedingungen war die Adsorption unverändert hoch und das Wasserbindungsvermögen nur unwesentlich gesteigert.

IV.5) Diskussion der Ergebnisse.

Wie die Versuche zeigten, bestand der größte Nachteil der Gasreaktionschromatographie in der Adsorptionskraft des CaH_2 , die vor allem bei kleineren Alkoholkonzentrationen eine Reproduktion der Ergebnisse verhinderte. - Die Adsorption war in wäßrigen Alkohollösungen höher als in organischen und stieg außerdem noch mit der Zunahme des Gehaltes der Säulenfüllung an Calciumoxyd und -hydroxyd. - Die Adsorption konnte auch durch Variation der Versuchsbedingungen (Erhöhung der f_c und der Temperatur) zum Zwecke einer verstärkten Desorption nicht beseitigt werden. - Außerdem ließ sich das Verkleben des CaH_2 nach der Reaktion, was zur Verminderung des Gasmengens flusses führte, auch durch Zugabe größerer Mengen inerten Trägers nicht völlig verhindern. Besonders für ein Routineverfahren ist aber die Konstanz der Versuchsparameter unbedingt notwendig. - Die für ein Routinever-

fahren notwendige rasche Aufeinanderfolge der Analysen war namentlich für größere Probemengen nicht erreichbar, weil dazu viel zu große Mengen an CaH_2 nötig gewesen wären.

Somit mußte die Gasreaktionschromatographie mit CaH_2 zur Eliminierung des Wassers als völlig ungeeignet sowohl für die Routineanalyse als auch für Einzeluntersuchungen angesehen werden.

V.) Versuche zur Auftrennung der niedrigen aliphatischen Alkohole und ihre Abtrennung von Aethanol.

Da es weder gelungen war, eine ausreichende Genauigkeit des Ausschüttelungsverfahrens zu erreichen, noch die Gasreaktionschromatographie für die Zwecke der routinemäßigen Aethanolbestimmung zu adaptieren, sollte es das Ziel der nachfolgenden Versuche sein, eine Säule zu entwickeln, die geeignet war, aus ihrer wäßrigen Lösung die niedrigen aliphatischen Alkohole aufzutrennen. Die Säule mußte auch geeignet sein, den Aethanol eindeutig von anderen flüchtigen Substanzen abzugrenzen.

Da die Säulen selbst angefertigt wurden, war es zunächst nötig, die günstigsten Bedingungen für die Bereitung von Säulen mit hoher Trennwirkung zusammenzustellen (Abschn. V.A).

Da die Serumproben direkt eingespritzt werden sollten, um eine Ausschüttelung zu umgehen, aber eine direkte Injektion in den Probeneinlaß wegen der erheblichen Rückstandsbildung nicht möglich war, mußte eine kleine Verdampfungskammer konstruiert werden. (Abschn. V.B).

Ferner mußte ein für die Gaschromatographie geeigneter Enteiweißungsprozeß für Blutproben gefunden werden (Abschn.V.C).

V.A) Herstellung der Säulenfüllungen.

Angaben für die Bereitung von Säulen finden sich vor allem in den Monographien von KAISER (1), BAYER (2) und KEHLEMANN (3). Dennoch seien diejenigen Arbeitsvorschriften für die Füllung von Säulen mitgeteilt, die sich im Laufe der Versuche als optimal herausstellten und die teilweise von den in der Literatur angegebenen Vorschriften abweichen. Außerdem konnten keine Literaturangaben gefunden werden, welche die Füllungen von Säulen mit Phasen stark unterschiedlicher Polarität behandeln. Hierüber waren eigene Untersuchungen erforderlich. Die Herstellung der Säulenfüllungen ist ein sehr wichtiges

Problem, da die Art der Bereitung für die Bodenzahl der Säule und damit für ihre Trennleistung von entscheidender Bedeutung ist.

V.A,1) Bearbeitung des Rohres.

Zur Aufnahme der Füllung diente ausnahmslos Kupferrohr (6 x 0,5 mm), das den Vorteil hat, nach dem Ausglühen leicht biegsam zu sein. Das Rohr von entsprechender Länge wurde über dem Brenner kurz bis zur Rotglut erhitzt, abgeschreckt und 2 mal mit 15%iger HCl ausgewaschen, um anhaftendes Kupferoxyd zu entfernen, das sich bei der Bearbeitung gebildet hatte und von dem eine katalytische Wirkung hätte ausgehen können. Das Rohr wurde dann mit Wasser, Aceton und Aether ausgewaschen, getrocknet und nach der Füllung über eine selbstgefertigte Biegevorrichtung spiralenförmig gebogen. Dabei war darauf zu achten, daß der innere Durchmesser der Spirale nicht unter 12 cm lag, damit das Trennvermögen der Säule in diesem Teil nicht ungünstig beeinflußt werden konnte.

V.A,2) Bearbeitung des inerten Trägers.

Es kam ausnahmslos Sterchamol (Fa. Roth und Merck) zur Anwendung. Das Sterchamol wurde 3 mal mit ca. 15%iger Salzsäure gekocht und dann von Chloridionen freigewaschen. Der größte Teil des Wassers wurde mit Aceton entfernt und das Sterchamol ca. 24 Std. im Trockenschrank bei 120° C - 140° C getrocknet. Danach wurde es gesiebt und nur die Siebfraction verwendet, deren Korngröße zwischen Sieb 4 u. 5 des DAB6 lag, um eine möglichst einheitliche Füllung zu erhalten. Diese Forderung wurde nur von ca. 40% des zu Anfang eingewogenen Sterchamols erfüllt, ca. 50% betrug eine 2. Fraktion, deren Korngröße zwischen Sieb 5 und Sieb 6 lag, der Rest war unbrauchbarer Staub. Das Sterchamol wurde dann mit 0,5% Natriumcapronat als "tailing-reducer" imprägniert und erneut gesiebt. Als Lösungsmittel für Natriumcapronat diente Methanol.

V.A,3) Aufbringen der flüssigen Phase.

Zum Imprägnieren des Sterchamols bewährte sich folgendes Verfahren. Die flüssige Phase wurde in einem mit Na_2SO_4 getrocknetem Solvens gelöst, dessen Menge so bemessen wurde, daß die angewendete Menge Sterchamol gerade gut durchfeuchtet war. Keineswegs durfte zuviel Lösungsmittel verwendet werden, weil sich sonst, durch abdestillierendes Solvens mitgeführt, flüssige Phase am Rand der Schale festsetzte und für die Imprägnierung verloren ging. Die Mischung wurde dann unter dauerndem Umrühren auf dem Wasserbad erwärmt, bis der größte Teil des Lösungsmittels abgedampft war, und das Gemisch unter dem Föhn dann so weit nachgetrocknet, bis das Pulver nur noch schwach feucht war. Die endgültige Trocknung erfolgte unter gelegentlichem Umrühren im Trockenschrank bei $40^\circ - 50^\circ \text{C}$ etwa 10 Stunden lang. Auch hier war nach dem Imprägnieren erneutes Sieben erforderlich, da Wert auf einheitliche Korngröße gelegt wurde.

V.A,4) Das Aufbringen mehrerer flüssiger Phasen.

Das eben beschriebene Verfahren ist leicht anwendbar, solange es sich nur um eine Flüssigkeit handelt, die aufgetragen werden soll. Gelangt jedoch eine Mischung mehrerer flüssiger Phasen zur Anwendung, die eventuell auch noch in ihrer Polarität und damit in ihrem Verhalten gegenüber Lösungsmitteln unterschiedlich sind, so wird das Imprägnieren etwas komplizierter. Da Säulen mit Phasen stark divergierender Polarität bisher kaum angewendet wurden, waren eigene Untersuchungen notwendig, um optimal trennwirksame Imprägnierungen zu ermitteln.

Es sind 4 verschiedene Methoden möglich, um 2 verschiedene flüssige Phasen für die Trennwirkung nutzbar zu machen:

- 1.) Als Vor- und Hauptsäule werden 2 verschiedene einheitlich imprägnierte Säulen hintereinandergeschaltet (M I).

- 2.) Anteilige Mengen Sterchamol werden getrennt mit den flüssigen Phasen imprägniert und die Imprägnate innig vermischt (M 2).
- 3.) Das Sterchamol wird nacheinander mit den flüssigen Phasen getränkt. Dazwischen wird das Imprägnat getrocknet (M 3).
- 4.) Beide flüssige Phasen werden in einem geeigneten Lösungsmittelgemisch gelöst und der Träger mit dieser Lösung imprägniert (M 4).

Zuerst sollte die Abhängigkeit der Trennleistung von der Art der Imprägnierung an dem System Diglyzerin-Flexol 8N8 studiert werden. Die beiden Substanzen unterscheiden sich in ihrer Polarität schon recht beträchtlich, Diglyzerin ist stark, Flexol 8N8 nur sehr schwach polar. Als Kriterien sollten das Verhalten der Säulen gegen wäßrige Proben und die Auftrennung eines Substanzgemisches bei konstanten Versuchsbedingungen dienen.

Zunächst wurde die Säule 29c getestet, die aus einer Diglyzerin-Vorkolonne und einer Flexol-Hauptkolonne bestand (M I). Diese Säulenkombination hatte das größte Rückhaltevermögen für Wasser, aber die schlechteste Trennwirkung. Wie aus der nachstehenden Tabelle 6 hervorgeht, lag die t_R für Wasser bei 16'15". Die Formen der Zacken waren unbefriedigend und ein ausgesprochenes "tailing" zu verzeichnen. +)

Das Testgemisch war nur in 3 Peaks aufgeteilt, die drei Alkohole erschienen als einheitliche Zacke.

Bei der Säule 29a mit der Mischung getrennter Imprägnate (M 2) war die Trennung erheblich verbessert und die Zacken hatten an Schärfe gewonnen. Das Retentionsvermögen für Wasser war am schwächsten ausgeprägt, die t_R lag bei 10'30", war also

+) Unter "tailing" versteht man eine Abweichung von der Gaußkurve im Sinne einer Schwanzbildung. Es entsteht durch Adsorptionseffekte am Träger (KIESER, 72).

Tabelle 6

Substanz	Säule 29 c	t _R auf	
		Säule 29a	Säule 29b + d
Aceton	3'40"	3'50"	4'22"
Methanol	5'33"	4'10"	4'47"
Aethanol	5'33"	5'40"	6'33"
Isopropanol	6'10"	6'39"	7'27"
Aethylmethylketon	6'45"	7'28"	8'26"
Wasser:			
Beginn	13'30"	9'	11'30"
t _R	16'15"	10'30"	13'

Thermostatentemp.: 100° C

fc: 1,2 atü = 162 ml H₂/Min.

Detektorstrom: 280 mA

Probe: 5 µl bzw. 50 µl (H₂O)

Testgemisch: je 1% der Substanzen in Amylacetat.

um fast 6 Min. geringer als bei der vorherigen Säule. Das Trennvermögen war stark verändert, Isopropanol wurde eine halbe Minute, Aethylmethylketon 45 Sekunden später eluiert. Methanol erschien 1'30" früher, während die Retentionszeiten für Aceton und Aethanol unverändert blieben. Es konnten alle drei Alkohole aufgetrennt werden, jedoch fielen jetzt die Zacken von Methanol und Aceton zusammen.

Zwischen der Säule 29b und 29d, bei denen die beiden flüssigen Phasen hintereinander (M 3) und gemeinsam (M 4) dem inerten Träger aufgegeben wurden, bestanden nur unwesentliche Unterschiede im Verhalten gegen Wasser und im Trennvermögen, so daß sie gemeinsam besprochen werden können. Das Rückhaltevermögen gegen Wasser nahm eine Mittellage ein, die Retentionszeit lag bei 13 Minuten. Die Auftrennung der Substanzen

war noch nicht ausreichend gelungen, der Abstand zwischen den Retentionswerten für Aceton und Methanol jedoch erneut größer geworden, und bei einigen Versuchen mit vermindertem Druck und niedrigerer Temperatur war bereits eine Trennung angedeutet. Bei den übrigen Substanzen waren Verlängerungen der Retentionszeiten zwischen 37 und 58 Sekunden eingetreten, wodurch die Retentionswerte erneut auseinander rückten. Die Formen der Zacken waren scharf und die Grundlinie wurde schnell wieder erreicht.

Diese beiden Säulen erfüllen also am besten die Anforderungen, so daß die gemeinsame Imprägnierung wegen der einfacheren Ausführbarkeit empfohlen werden kann (M 4), wenn der Polaritätsunterschied der flüssigen Phasen, wie im vorliegenden Fall, nicht zu groß ist.

Schwieriger gestaltet sich die Imprägnierung von Säulen mit flüssigen Phasen sehr stark unterschiedlicher Polarität. Diese Verhältnisse wurden für das System Diglyzerin-Paraffinöl geprüft. Zu diesem Zwecke wurden wieder 4 verschiedene Säulen nach obigem Schema (M 1 - M 4) imprägniert und ihr Verhalten gegenüber einem Testgemisch (siehe Tab. 7) sowie ihr Rückhaltevermögen für Wasser untersucht.

Auch hier war das Trennergebnis der nach Punkt 1 hergestellten Kombination (Säule 28a) (M 1) am schlechtesten und das Wasserrückhaltevermögen am besten (t_R 19'30"). Die Peakformen waren völlig unbefriedigend und zeigten eine beträchtliche Schwanzbildung. Das Testgemisch war nur in 4 Zacken aufgetrennt, selbst n-Propanol und Dichloraethan, mit einer t_R -Differenz von 1'14", waren nur andeutungsweise getrennt. Eine Trennung von Schwefelkohlenstoff und Methylaethylketon war nicht zu erzielen.

Die nach Verfahren M 2 hergestellte Säule 28 b zeigte ein völlig anderes Verhalten. Ihr Wasserrückhaltevermögen war am wenigsten ausgeprägt. Das Verhalten gegen Wasser ist jedoch für

diese Art von Säulen sehr wichtig, da es darauf ankommt, nur möglichst geringe Diglyzerinmengen zu verwenden, um den apolaren Charakter der Säule nicht zu stark zu verringern. - Das Testgemisch war bereits wesentlich besser aufgetrennt, lediglich Schwefelkohlenstoff und n-Propanol waren nicht aufgelöst, die Trennung jedoch durch "Buckelbildung" der Zacke angedeutet. Außerdem trat eine Umstellung in der Elutionsreihenfolge auf; n-Propanol erschien jetzt vor Dichloraethan. Insgesamt waren deutliche t_R -Verkürzungen bei wesentlich verbesserten Trennungen festzustellen.

Zwischen den nach Verfahren M 3 und M 4 hergestellten Säulen 28c und 28d waren nur geringe Unterschiede festzustellen. Das Wasserrückhaltevermögen war auf beiden Säulen ähnlich, die etwas kürzeren t_R auf Säule 28d verschlechterten die Trennung keineswegs. Das Testgemisch war ausgezeichnet in die Komponenten aufgelöst, sogar bei nur 23 Sekunden t_R -Differenz

Tabelle 7

Substanz	t_R auf			
	Säule 28a	Säule 28b	Säule 28c	Säule 28d
Aceton	2'28"	1'56"	1'44"	1'50"
Aethylmethylketon	4'17"	3'32"	3'7 "	3'5 "
Schwefelkohlenstoff	3'35"	4'	3'32"	3'28"
n-Propanol	6'6"	4'51"	4'13"	4'5"
Dichloraethan	4'52"	5'38"	5'15"	4'45"
Cyclohexan	7'5"	8'21"	7'22"	7'5"
Wasser: Beginn	16'30"	14'	15'	14'40"
t_R	19'30"	16'10"	17'10"	16'45"

Thermostatentemp.: 100°C

Detektorstrom: 280 mA

fc (MeSteil): 1,6 atü = 163 ml H_2 /min.

Probe: 5 μ l bzw. 50 μ l bei H_2O

Testlösung: 1% Lsg. d. Substanzen in Amylacetat.

zwischen Schwefelkohlenstoff und Aethylmethylketon.

Da es für Säulen mit flüssigen Phasen so stark divergieren-
der Polarität mühevoll ist, nach einem geeigneten Lösungs-
mittelgemisch für die Phasen zu suchen, wird empfohlen die
Phasen nacheinander auf das Trägermaterial zu bringen (M 3).
Doch muß vermieden werden, bei der 2. Imprägnierung zu stark
zu erwärmen, da evt. die zuerst aufgebrachte Phase wieder
aus dem Imprägnat ausgeschmolzen werden könnte und so eine
ungleichmäßige Beladung resultieren würde.

Aus den Versuchen geht hervor, welcher großer Unterschied zwi-
schen den Säulencharakteristiken in Abhängigkeit von der Art
der Säulenbereitung besteht. Es treten nicht nur Veränderun-
gen der Zackenformen, der Retentionszeiten und der theoreti-
schen Bodenzahlen der Säulen auf, sondern sogar Veränderungen
in der Elutionsfolge der Substanzen ein.

In einem Schema soll die Herstellung der Säulen noch einmal
zusammengefaßt werden:

Rohes Sterchamol



3 mal Kochen mit ca. 15%iger HCl



Nachwaschen mit Wasser
und Aceton



12 - 14 Stunden bei 140° C
trocknen



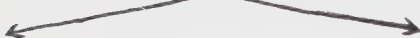
Imprägnieren mit 0,5% Natriumcapronat
als tailing reducer



Sieben, Siebfraction zwischen
Sieb 5 und Sieb 6 (DAB6)



I.



II.

Imprägnieren mit Phasen
ähnlicher Polarität:

Zusatz von flüssiger Phase(n)
in geeignetem Solvens zu
Sterchamol (inerte Phase nur
bis zur gleichmäßigen Durch-
tränkung benetzen)



Wasserbad, (größten Teil
des Solvens abdampfen, stän-
diges Rühren)



unter Föhn trocknen (bis
zur schwachen Feuchte)



10-14 Stunden bei 40° C im
Trockenschrank nachtrocknen



erneutes Sieben.

Imprägnieren mit Phasen
stark unterschiedlicher
Polarität:

erste flüssige Phase in
geeignetem Solvens zugeben
(konzentrationsmäßig
schwächerer Anteil)



trocknen wie unter I.



zweite Phase (Hauptanteil)
in geeignetem Solvens lö-
sen



trocknen wie unter I.

(übermäßiges Erwärmen beim
Abdampfen des Lösungsmit-
tels vermeiden)



erneutes Sieben.

V.B) Konstruktion einer Verdampfungskammer.

Der Injektionseinlaß des gaschromatischen Gerätes besteht nur aus einem engen. auf ca. 160°C geheiztem Rohr, das nur sehr mühsam zu reinigen ist. Da jedoch eine Einspritzöffnung benötigt wurde, die mit wenigen Handgriffen zugänglich und leicht von Rückständen zu reinigen war, wurde eine kleine Verdampfungskammer konstruiert.

Über die Herstellung einer Verdampfungskammer für präparative Zwecke berichtete BAYER (52). Um eine große Oberfläche zu erhalten, war diese Kammer mit Metallwolle gefüllt, die Temperatur lag um 30°C - 60°C unter dem Siedepunkt der höchst-siedenden Komponente. Auch CLARK (53) beschrieb ein Injektionssystem für die Gaschromatographie. Er forderte eine rasche Verdampfung der Proben, die durch eine möglichst enge Zuleitung in die Trennkolonne gelangen sollen.

Angaben über eine kleine Verdampfungskammer finden sich ferner bei MACHATA (54).

Das Volumen der Verdampfungskammer wurde zunächst bewußt groß gewählt (ca. 16 ml), um die Kammer auch bei Routineanalysen nur in möglichst großen Abständen reinigen zu müssen. Die Kammer sollte mit Hilfe eines gleichfalls selbst konstruierten Mehrwegehahnes ausschaltbar sein, um die Verdampfungszeit beliebig variieren zu können. Kammer und Hahn tauchten in ein auf 120°C erhitztes Bad mit Calciumchloridlösung. Die Zu- und Ableitungen wurden mit Asbestband isoliert. Es gelang jedoch auch nach sorgfältigem Einschleifen der Laufflächen nicht, den Hahn bei den hohen Temperaturen gasdicht zu halten. Ferner zeigte sich, daß das Volumen der Verdampfungskammer zu groß gewählt worden war, da die verdampfte Probe infolge Wirbelbildung nicht konzentriert genug vom Gasstrom weitergeführt wurde. Die Zackenhöhe war bei Vorschaltung der Verdampfungskammer um ca. 30% niedriger und die Zacken waren bedeutend breiter und flacher. Bei der Prüfung mit einem aus

mehreren Komponenten bestehendem Gemisch war die Trennung sehr verschlechtert, da die Komponenten anscheinend verschieden rasch verdampften und nicht konzentriert genug zur Verteilung gelangten.

Deshalb wurde ein neuer Vorverdampfungsblock konstruiert, der ein erheblich kleineres Volumen hatte (ca. 3,5 ml). Als Heizung diente eine elektrische Heizplatte, deren Temperatur über einen Widerstand regelbar war. Für die untersuchten Stoffe war eine Heizplattentemperatur von 130° C optimal. Eine weitere Steigerung der Temperatur brachte keine Veränderungen der Retentionszeiten und der Zackenformen mehr mit sich, ein Zeichen, daß die Verdampfung optimal erfolgte.

Bei dieser relativ niedrigen Temperatur bestand auch keine Gefahr der Zersetzung von organischer Substanz. Das Volumen des Verdampfungsblockes wurde in Abänderung des Vorschlages von BAYER (52) und einem Vorschlag von MACHATA (54) folgend mit Glaswolle gefüllt, um eine große Verdampfungsoberfläche zu erhalten und die Reinigung durch einfache Herausnahme des Pfropfens mit den Verdampfungsrückständen zu erleichtern. Als Zu- und Ableitungen dienten, wie von CLARK (53) gefordert, sehr enge Rohre, die mit Asbestband isoliert waren, um eine Kondensation der aufgegebenen Probe zu verhindern. Die Reinigung war nach Lösung zweier Verschraubungen leicht vorzunehmen. Infolge der verlängerten Wege waren die Retentionszeiten der Substanzen im Durchschnitt um 10 - 20 Sekunden erhöht. Für Wasser betrug der Zuwachs auf langen Säulen allerdings bis zu 1 1/2 Minuten. Da die Reproduzierbarkeit der Verteilungsergebnisse mit Hilfe des Verdampfungsvorblocks ausgezeichnet war, wurde er für alle Proben benutzt, bei deren Verdampfung Rückstände auftraten.

V. C) Enteiweißung von Blutseren.

Eine direkte Injektion von Serum in die gaschromatogr. Appa-

ratur war nicht möglich, da das Eiweiß in der engen Nadel der Mikrospritze wegen der hohen Temperatur des Verschlußgummis der Einlaßöffnung sofort koagulierte. Außerdem mußte die Injektion von unbehandeltem Serum auch zu einer großen, nicht wasserlöslichen Rückstandsbildung führen und die Reinigung des Vorverdampfungsblocks wäre dadurch sehr erschwert worden. Wie ferner Vorversuche über die Verdampfungszeit von Serum auf einem beheizten Kupferblech gezeigt hatten, wurden die Verdampfungszeiten namentlich größerer Proben mit zunehmender Zahl der Injektionen bei eiweißhaltigem Serum immer länger, da die Wärmeleitung durch den Rückstand vermindert war. Es bildete sich rasch eine Haut um den Probetropfen, wodurch die Verdampfung stark verzögert wurde. Die Verdampfungszeit betrug bei 120°C für $50\text{ }\mu\text{l}$ Serum z.B. $2\text{ }1/2$ Minuten. Über diesen Nachteil berichtete auch DRAWERT u. KUPFER (51).

Eine große Anzahl von Substanzen sind in der Lage Eiweiß zu koagulieren, doch sind an ein Enteiweißungsmittel für Arbeiten mit der Gaschromatographie spezielle Anforderungen zu stellen. Die Substanz muß chemisch neutral sein, da z.B. starke Basen und Säuren die Metallwandungen der Einlaßöffnung infolge der dort herrschenden Temperatur von 130°C angreifen können. Die Substanz muß zuverlässig enteiweißen und sollte möglichst geringe Rückstände hinterlassen. Am leichtesten zu entfernen wären wasserlösliche Rückstände. Ferner darf die Substanz die zu verdampfenden Stoffe nicht adsorbieren und muß thermisch stabil sein, damit nicht Hydrolyse- oder Pyrolyseprodukte mit dem Trägergasstrom in die Apparatur gelangen und Säule und Detektor verunreinigen.

Als Enteiweißungsmittel wurden verschiedene Substanzen erprobt. Es kamen jeweils 4 ml Serum oder Vollblut zur Anwendung, die nach Zusatz des Enteiweißungsmittels zentrifugiert wurden. Aus 2 ml des Zentrifugats wurde der Rückstand durch

einstündiges Trocknen bei 120°C bestimmt. Zunächst wurde die Blutprobe mit 0,5 g 30%iger Perchlorsäurelösung versetzt. Dabei zeigte sich, daß dieses sehr bewährte Enteiweißungsmittel ein zu starkes Oxydationsmittel darstellte, welches das Metall der Kammerwandung und die Probe angriff.

Sodann wurden Metallsalze als Enteiweißungsmittel überprüft. Zuerst wurden 0,5 g getrocknetes Aluminiumsulfat zugesetzt. Dabei war jedoch kaum klare Flüssigkeit zu gewinnen und auch nach sehr scharfem Zentrifugieren blieb ein dunkelroter Brei zurück.

Von der Verwendung von Bleiazetat mußte Abstand genommen werden, da sich durch thermische Hydrolyse leicht Essigsäure hätte bilden können.

Bei der Erprobung von Bleinitrat erwies sich diese Verbindung als das beste Enteiweißungsmittel. Da bei Verwendung einer wäßrigen Lösung von Bleinitrat ein Pipettenfehler unvermeidlich gewesen wäre, wurden zu 4 ml Vollblut 1,5 g Bleinitrat in Pulverform gegeben. Der Rückstand von 2 ml enteiweißter Flüssigkeit betrug nur 270 mg und bestand fast nur aus kristallinem $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Die Gewinnung ausreichender Mengen enteiweißter, völlig klarer Flüssigkeit war durch Zentrifugieren leicht durchführbar. Zur Ermittlung derjenigen Bleinitrat-Menge, die für eine vollständige Enteiweißung gerade ausreichend war, wurden jeweils 4 ml Vollblut mit steigenden Mengen $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ versetzt. 100 - 400 mg $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ waren nicht ausreichend, da nicht ausreichende Volumina von klarem Zentrifugat zu gewinnen waren. Nach Zusatz von 450 mg war das Zentrifugat noch nicht ganz klar und meist auch etwas bräunlich verfärbt. Zur Sicherheit wurde daher die $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -Menge auf 520 mg erhöht. Die günstigsten Ergebnisse wurden bei folgender Arbeitsweise erzielt:

1 ml Vollblut oder Serum wird in einem Zentrifugenglas mit

Schliffstopfen mit 130 mg trockenem, pulverisiertem Bleinitrat versetzt, 1 Minute geschüttelt und sodann 10 Minuten bei 5000 U/min. zentrifugiert. Auf Luftabschluß ist zu achten, da sich sonst schnell ein Häutchen von Bleikarbonat bildet. Ein genaues Abwägen der Bleinitratmenge ist nicht notwendig. Die Substanz kann mit einem geeigneten Meßlöffel dosiert werden.

Soll das Zentrifugat längere Zeit aufbewahrt werden, so kann das Zentrifugat mittels Saugpipette (Bleigehalt) in ein kleines ca. 2 ml fassendes Schliffgefäß überführt werden. Aus einem solchen Gefäß kann die Probe auch leichter mittels der Mikrospritze entnommen werden.

V.D) Ermittlung optimaler stationärer Phasen für die Auftrennung der niedrigen aliphatischen Alkohole.

Über die gaschromatographische Analyse der niedrigen aliphatischen Alkohole gibt es bereits ein umfangreiches Schrifttum, auf das etwas ausführlicher eingegangen werden muß. Dabei handelt es sich jedoch meist um Einzeluntersuchungen und um Analysen von Lösungen der Alkohole in organischen Solventien und weniger um Verfahren, die für die Routineanalyse im wäßrigen Medium geeignet sind.

BODMER u. MAYEUX (8) trennten polare Substanzen an Trikresylphosphat und Polyglykol. SOCHOLOW (55), HASKIN et al. (58) sowie ROBERTS u. SHIENGKONG (59) benutzten zur Trennung der Alkohole (von C_1 - C_4) Cetylalkohol als stationäre Phase. PFENNINGER (56) trennte die Alkohole von C_1 - C_5 an 2 Säulen von Dioctylsebacat und Diaethyl-D-tartrat. Sechs der Alkohole des Isomerengemisches erschienen allerdings als Doppeltacken.

ROGOZINSKI et al. (57) trennten wäßrige Alkohollösungen auf Sorbitol und Diaethylsebacinat. ZAREMBO und LYSYJ (14) trennten Alkohole an einer 6,7m langen Säule mit höheren Aminen

als Füllung. Die Alkohole hatten jedoch sehr lange Retentionszeiten, und Spuren von Alkoholen neben viel Wasser konnten nicht erkannt werden. Die ausführlichsten Untersuchungen über die Spezifität ihres Verfahrens führten PARKER et al. (60) durch, welche die Retentionszeiten von 56 anderen flüchtigen Substanzen gleichfalls überprüften. Sie wandten ihr Verfahren auch auf die Blutalkoholanalyse an. Dichlormethan und Acetonitril minderten jedoch die Spezifität des Verfahrens. Weitere Autoren berichten über Trennungen von Alkoholen an "Tide" (MATUWANA u. KINOSHITA, 62), Triäthanolamin (SINGLIAR et al., 63) und verschiedenen stationären Phasen (HUNTER et al., 64).

Nach Überführung in die entsprechenden Salpetrigsäureester analysierten DRAWERT u. KUPFER (6) die Alkohole an einer Silikonölkolonne. Auch Oxydipropionitril als stark polare Phase eignete sich für die Bestimmung von Äthanol in Hefegärungsflüssigkeit (LACEY, 65). Weitere Literatur findet sich bei MACHATA (10), WOLTERS (11), MARIQ u. MOLLE (12), FELDSTEIN (13), ZAREMBO u. LYSYJ (14), KOROL (76) und MATUMOTO (77). Auch über die gaschromatographische Analyse von Alkoholen an Glycerin und Diglycerin liegt eine Reihe von Literaturstellen vor, so bei BROWNING und WATTS (66), HALSHAM u. JEFFS (67), ROSE (68) sowie COOK (69). SMITH (5) berichtet über Trennungen von wäßriger Lösung polarer Substanzen an 7 verschiedenen flüssigen Phasen: Glycerin, Polyglykol, Trikresylphosphat, Diglycerinaether, Triäthanolamin, Tween 80 und Oxydipropionitril. FOX (4) benutzte zwei hintereinander geschaltete Säulen von Diglycerin und Trikresylphosphat. Die Empfindlichkeit seiner Methode war jedoch nicht sehr groß. Die gleichen flüssigen Phasen verwandten BROWNING und WATTS (7). Sie stellten allerdings fest, daß das Glycerin bald abdampfte, und die Abtrennung von Wasser und Äthanol nicht immer ganz ausreichend war. - Auch COOK (69) berichtet über die geringe Lebensdauer von nur 2 Monaten bei einer Glycerinkolonne. -

SALO (70) trennte die Alkohole an einer Säulenkombination von Paraffinöl und Polyglykol. Die Retentionszeiten waren jedoch recht lang, und die Trennung von Aethanol und Isopropanol war unvollständig. - DREWS und SPECHT (71) trennten aliphatische Alkohole mit Siedepunkten über 100°C an Triäthanolamin.

Besonders oft ist zu Trennungen der aliphatischen Alkohole Polyglykol benutzt worden. - A. HEYDRICKX et al. (74) berichteten über Bestimmungen von Methanol und Aethanol im Blut nach Enteiweißung an einer Propylenglykolkolonne. - MATUMOTO (77) benutzte eine Polyglykol 6000-Kolonne zur Blutalkoholbestimmung und enteiweißte mit 3,4%iger Perchlorsäurelösung. - Auch MACHATA (54) benutzte eine Polyäthylenglykolkolonne sowie einen Flammenionisationsdetektor. Dadurch wurde die Eliminierung störenden Wassers umgangen, da der Detektor darauf nicht anspricht. Bei Verwendung eines inneren Standards soll die Streuung bei $\pm 5\%$ liegen. - CHUNDELA u. JANAK (78) bestimmten Blutalkohol, sowie andere flüchtige Bestandteile von Blut- und Körperflüssigkeiten. Zur besseren Retention des Wassers verwendeten sie wie SWOBODA (79) u. WEINIG u. Mitarbeiter (80) eine Diglyzerinvorkolonne, die Hauptkolonne enthielt ebenfalls Polyglykol. Zur Eichung dienten Alkoholtestlösungen, die Streuung wurde ebenfalls mit $\pm 5\%$ angegeben.

Die eigenen Erfahrungen mit Polyglykol waren jedoch bei weitem nicht so positiv, vor allem war das Wasserretentionsvermögen nicht so stark ausgeprägt, wie z.B. bei Diglyzerin. Polyglykol hat außerdem eine relativ niedrige Temperaturgrenze, was bei Dauergebrauch durch Abdampfen der flüssigen Phase zu Änderungen der Versuchsparameter führen kann. Die Auftrennung von Aethanol und Isopropanol war nicht vollständig, außerdem hatte Benzol eine ganz ähnliche Retentionszeit wie Aethanol. Über ähnliche Erfahrungen mit Polyglykol berichtete auch KIESER (73).

Der erste, der mit einer Diglycerinvorkolonne arbeitete, war SWOBODA (79), er trennte die Alkohole auch an einer Polyglykolkolonne auf. Das Wasser wurde mit Luft zurückgespült. Umfangreiche Untersuchungen über die gaschromatographische Analyse der aliphatischen Alkohole im Zusammenhang mit den Ermittlungen über Fäulnisalkohole stammen von WEINIG u. Mitarbeitern (9, 80, 81). Sie bestimmten die Alkohole mikrochemisch und gaschromatographisch. Zum Zwecke der Reinigung und Anreicherung wurde das Analysenmaterial zunächst destilliert und dann eine Probe auf Polyäthylenglykol/Celite eingespritzt. Später verwendeten auch sie eine Glycerinvorkolonne.

Den meisten der beschriebenen gaschromatographischen Verfahren haften eine Reihe von Nachteilen an. Die Methoden sind zum größten Teil umständlich und zeitraubend, da zwecks Anreicherung häufig eine Destillation vorangehen muß. Auch geben manche Säulen nur eine schlechte Abtrennung der Alkohole von der wäßrigen Phase, bei anderen Säulen sind die Analysenzeiten sehr groß. Nur bei einem Verfahren wurde die Frage der Spezifität überprüft.

Da die bisher beschriebenen Säulen zur Auftrennung der unteren aliphatischen Alkohole aus ihren wäßrigen Lösungen, insbesondere im Hinblick auf die spezifische Bestimmung des Äthanolis nicht voll befriedigen konnten, wurden eigene Versuche unternommen, um Säulen verbesserter Trennwirkung herzustellen.

V.D,1) Erprobung von Säulen mit einer flüssigen Phase.

Zur Erprobung verschiedener flüssiger stationärer Phasen dienten Versuchskolonnen von 1,4 - 1,8 m Länge mit Sterchamol als inertem Träger, die, falls notwendig und erfolgversprechend, zur Verbesserung der Trennung verlängert wurden. Die Versuchskolonnen sind in der Tabelle am Schluß der Arbeit zusammengefaßt, über die Art der Säulenherstellung gibt

Abschn. V.A Auskunft. Die Konzentrationen der flüssigen Phasen in der Säulenfüllung betrugen fast ausnahmslos 30%, und auch die anderen Versuchsparameter wurden überall gleich gehalten, um gute Vergleichsmöglichkeiten zwischen den verschiedenen Kolonnen zu haben.

Obgleich es nicht sehr aussichtsreich erschien, apolare flüssige Phasen zur Analyse so stark polarer Substanzen wie der Alkohole heranzuziehen, wurden sie dennoch der Vollständigkeit halber getestet. Später zeigte sich (siehe Abschn. VI und VII), daß die hier gewonnenen Erfahrungen durchaus verwertet werden konnten.

Zunächst wurde eine reine Paraffinölkolonne (Säule 1) ausprobiert, die ca. 33% Beladung aufwies. Wie zu erwarten war, zeigte diese Kolonne keine besonders guten Trenneigenschaften. So wurden Methanol, Aethanol und Isopropanol nicht voneinander getrennt. Auch die Auftrennung eines Testgemisches aus polaren bis schwachpolaren Substanzen (Aether, Aceton, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Aethanol) war keineswegs befriedigend. Die Zacken zeigten eine ziemlich ausgeprägte Schwanzbildung und die Säule besaß erwartungsgemäß keine Selektivität für Wasser.

Als nächste Säule wurde eine Silikonöl-Säule (Fa. Beckman) ausprobiert. Hier konnte eine sehr knappe Auftrennung von Aethanol und Isopropanol erzielt werden, sofern die beiden Substanzen in vergleichbarer Konzentration vorlagen. Trotz ihres apolaren Charakters trennte die Säule überraschend gut; fast alle acht Alkohole eines Testgemisches der unteren aliphatischen Alkohole erschienen als Einzelzacken (Chromatogr. 5). Lediglich bei polaren Substanzen waren die Zackenformen nicht völlig befriedigend. Die Zacken waren etwas verbreitert und es trat eine schwächere Schwanzbildung auf. Naturgemäß war auch das Wasserrückhaltevermögen äußerst gering, so daß auch diese Säule zumindest

in reiner Form nicht verwendet werden konnte. Auch die Erprobung dieser Säule war nicht nutzlos, da sie im Abschn. VI verwendet werden konnte.

Auf einer Säule mit Trikresylphosphat (Säule 4) erfolgte die Trennung der Alkohole in der Reihe der Siedepunkte. Wasser brach als erste Substanz noch vor dem Methanol durch. Die Säule zeigte eine sehr unbefriedigende Trennleistung; so erschienen Methanol, Aethanol und Isopropanol als Dreifachzacke und n-Propanol und sek.-Butanol als Doppelzacke. Eine Verringerung der Temperatur und der f_c zur Steigerung der Trennleistung vermochte das Ergebnis nicht zu verbessern.

Eine etwas bessere Aufteilung der Alkohole zeigte Säule 5 mit 30% Oxydipropionitril. Bis auf Methanol und Isopropanol waren die Alkohole gut aufgetrennt, lediglich bei sek.-Butanol und n-Propanol war die Trennung unzulänglich. Wasser erschien erst hinter der Zacke des sek.-Butanol. Bemerkenswert war die geringe Adsorption des Wassers an der Säule, so daß nach Injektionen wäßriger Lösungen die Null-Linie schon nach insgesamt 10 Minuten wieder erreicht war (Thermostatentemp.: 100°C ; f_c : 1,5 atü; 50 μl Probe). Der Nachteil dieser Substanz, die später noch in einer Reihe von Kombinationssäulen Anwendung fand, war die niedrige Temperaturgrenze von nur $70^{\circ}\text{C} - 90^{\circ}\text{C}$.

In ihrem Trennverhalten ganz ähnlich war die Säule 6 mit Dinonylphthalat. Auch hier trat die Dreifachzacke von Methanol-Aethanol-Isopropanol auf. Das Wasser erschien allerdings bereits vor dem Methanol und auch hier waren unter den gleichen Bedingungen nach 12 - 15 Minuten die letzten Spuren von Wasser aus der Säule entfernt.

Auch die Säule 10 mit Sebacinsäureaethylhexylester konnte wegen ihrer geringen Selektivität für Wasser keine Verwendung finden. Die Alkohole waren bis auf Aethanol und Isopropanol gut voneinander getrennt, die Reihenfolge der Eluierung entsprach etwa der Reihenfolge der Siedepunkte.

Da die bisher verwendeten flüssigen Phasen vor allem wegen ihrer unzureichenden Retention des Wassers keine Anwendung finden konnten, wurden Substanzen zu Trennversuchen herangezogen, deren hydrophiler Charakter eine bessere Retention des Wassers erwarten ließ.

Zunächst wurde Polyglykol 1000 (Fa. Merck) geprüft (Säule 2). Infolge der geringen Länge der Versuchssäule war eine Trennung zwischen Methanol und Aethanol nur angedeutet, Aethanol und Isopropanol erschienen als Doppelzacke. Auch nach Verdoppelung der Säulenlänge wurden Aethanol und Isopropanol nicht aufgeteilt, während Methanol jetzt ausreichend abgetrennt war. Das Wasser wurde hinter n-Propanol eluiert und es dauerte lange, bis alles Wasser wieder aus der Säule entfernt war. Da auch die Retentionszeiten für viele Substanzen sehr lang waren, sollte die Analysenzeit durch Steigerung der Temperatur verkürzt werden. Eine Erhöhung der Temperatur auf 130° C brachte jedoch lediglich eine Verschlechterung der Trennung mit sich, während das Wasser nicht wesentlich schneller aus der Säule entfernt wurde.

Auf der Säule 12 mit Triaethylenglykol, das dem Polyglykol stark ähnelt und sich nur durch einen geringeren Polymerisationsgrad unterscheidet, wurde der Isopropanol zwischen Methanol und Aethanol eluiert. Die Affinität zu Wasser war größer als bei Säule 2 (Polyglykol). Das Wasser erschien erst weit hinter dem n-Propanol kurz vor n-Butanol. Da Triaethylenglykol jedoch keine bedeutend besseren Trenneigenschaften zeigte und außerdem den Nachteil einer niedrigeren Temperaturgrenze aufwies, wurde auf seine weitere Anwendung verzichtet.

Die wichtige Säule 3 enthielt als flüssige Phase Diglyzerin, das sich durch einen ausgeprägten polaren Charakter und durch das stärkste Rückhaltevermögen für Wasser auszeichnet. Das Wasser wurde weit hinter iso-Amylol und anderen Substan-

zen mit beträchtlich höheren Siedepunkten eluiert. Aethanol und Isopropanol wurden gut voneinander getrennt, dagegen hatten Aethanol und iso-Butanol, n-Propanol und Methanol, sowie n-Butanol und iso-Amylol die gleichen Retentionszeiten. Die Analysenzeit für wäßrige Lösungen war sehr lang und betrug bei 100° C Thermostatentemperatur, einer f_c von 1 atü und für 50 μ l Probe ca. 55 Minuten.

Bei der Injektion einer Testlösung bestehend aus Aether, Aceton, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, n-Propanol, Isopropanol, Methanol und Aethanol zeigten sich nur 2 Doppelzacken von Methanol und n-Propanol, sowie Aether und Tetrachlorkohlenstoff. Aethanol war deutlich von den anderen in Blut und Geweben häufig vorkommenden flüchtigen Substanzen abgetrennt und die Säule wies somit eine hohe Selektivität für Aethanol auf. Diese Beobachtung sollte sich für die Routineanalyse noch als wichtig erweisen (siehe Abschn. V.F).

Um die Trennleistung der Säule noch weiter zu verbessern, wurde eine Säulenverlängerung und eine gleichzeitige Verstärkung des Gehaltes an flüssiger Phase vorgenommen: Säule 7 (Beladung: 30% Diglyzerin/Sterchamol; Länge 3m). Die Auftrennung der niedrigen aliphatischen Alkohole wurde dadurch aber nicht weiter verbessert.

V.D,2) Erprobung von Kombinationssäulen.

Die getesteten flüssigen Phasen hatten erwartungsgemäß nicht die Lösung aller Trennprobleme gebracht. Dennoch war die Untersuchung der Säulencharakteristiken von Reinsubstanzen notwendig, da die Herstellung von Kombinationssäulen nur erfolgversprechend sein kann, wenn die Charakteristika der Einzelphasen bekannt sind. Die Eigenschaften von Kombinationskolonnen ergeben sich jedoch nie aus der Addition der Einzeleigenschaften der verwendeten flüssigen Phasen. Dafür werden noch einige Beispiele folgen.

Zur Erprobung von Kombinationssäulen wurden sowohl verschiedene Versuchssäulen hintereinander geschaltet (M 1), als auch Säulen mit gemeinsamer Imprägnierung erprobt (M 3, M 4).

Nach dem Vergleich der Auftrennung der Alkohole an Säule 2 (Polyglykol) und Säule 3 (Diglyzerin) erschienen Versuche mit einer Kombinationskolonne der beiden Substanzen erfolgversprechend. Durch den Diglyzerinanteil war ein besseres Retentionsvermögen für Wasser, sowie eine verbesserte Auftrennung der Alkohole zu erwarten. Allerdings war auch vorauszusehen, daß bei einer solchen Kolonne die Retentionszeiten von Methanol und Aethanol sehr ähnlich sein würden.

Zunächst wurde der Träger mit Diglyzerin- und Polyglykol im Verhältnis 2 : 1 imprägniert (Säule 14). Hierbei war jedoch die Auftrennung unbefriedigend, die Retentionszeiten waren beträchtlich lang und das Wasserretentionsvermögen stärker als benötigt ausgeprägt.

Bei der Erprobung von Diglyzerin und Polyglykol im Verhältnis 1 : 1, (Säule 8, Länge 3 m) wurden wie erwartet Methanol und Aethanol als Doppelzacke eluiert, während die übrigen Alkohole ausgezeichnet aufgetrennt waren (Chromatogr. 6). Allerdings waren die Retentionszeiten infolge der Länge der Säule ebenfalls recht hoch, wodurch lange Analysenzeiten und geringere Nachweismöglichkeiten bedingt waren. Um die Retentionszeiten zu verkürzen, gibt es vier Möglichkeiten:

- 1.) Verkürzung der Säule.
- 2.) Erhöhung der Temperatur (siehe Abschn. II,2.).
- 3.) Erhöhung der f_c .
- 4.) Verminderung der Konzentration der flüssigen Phase.

Eine Verkürzung der Säule 8 auf 2,2 m senkte die Analysenzeit für wäßrige Proben auf 40 Minuten, jedoch war die Trennung speziell bei höherer f_c verschlechtert und iso-Butanol und n-Propanol erschienen wieder als Doppelzacke. Eine Erhöhung

der Temperatur auf 130° C verschlechterte die Trennung ebenfalls. Deshalb wurde lediglich der Säulenvordruck entsprechend Punkt 3 auf 2 atü erhöht. Bei einer Thermostatentemperatur von 100° C wurden die in Tabelle 8 enthaltenden Werte ermittelt:

Tabelle 8

	t_R bei	f_c
Substanz	1,5 atü	2 atü
Isopropanol	3'45"	2'53"
Methanol	4'34"	3'20"
Aethanol	4'36"	3'21"
sek-Butanol	5'40"	4'7 "
n-Propanol	6'52"	5'5 "
iso-Butanol	7'28"	5'27"
n-Butanol	10'46"	7'50"
iso-Amylöl	12'40"	9'45"

Thermostatentemp.: 100° C

Detektorstrom. 300 mA

Probe: 5 µl wäßriger Lösung (ca. 2°/oo der Substanzen enthaltend)

Kolonne: Säule 8

Kolonnenlänge: 3 m

Eine weitere Verminderung der Retentionszeiten sollte durch Herabsetzung des Diglyzeringehaltes der Kolonne erreicht werden (M 4). Zu diesem Zwecke wurden zunächst Säule 3 (enthaltend Diglyzerin/Sterchamol in 20%iger Konzentration) und Säule 12 (enthaltend Triäthylenglykol auf Sterchamol in 30%iger Konzentration) hintereinander geschaltet. Dadurch sank der Gehalt der flüssigen Phase an Diglyzerin von 50% auf 40%. Die Retentionszeiten waren zwar verringert, das Trennvermögen der Säulenkombination jedoch unbefriedigend. Deshalb wurde die Säule 11 mit einer gemeinsamen Imprägnie-

rung und weiter verringertem Diglyzeringehalt hergestellt (Verhältnis Diglyzerin zu Polyglykol wie 1 : 2). Eine Steigerung des Polyglykolgehaltes auf Kosten des Diglyzerins erbrachte jedoch trotz des Vorteiles der stark verkürzten Retentionszeiten eine Trennungsverschlechterung. Isopropanol trat vor Aethanol und Methanol aus der Säule aus und das Wasser wurde bereits zwischen iso-Butanol und sek.-Butanol eluiert. Diese Säule konnte jedoch in verlängerter Form (Säule 32) noch, wie in Abschn. VI angegeben, Verwendung finden.

Obwohl eine Auftrennung der unteren aliphatischen Alkohole bis auf Methanol - Aethanol mit Säule 8 (Länge 3 m) erreicht werden konnte, wurden dennoch weitere Kombinationssäulen erprobt, um evtl. noch eine zusätzliche Auftrennung dieser beiden wichtigen Alkohole zu erhalten.

Ogleich gegen die Verwendung von Oxydipropionitril die niedrige Temperaturgrenze sprach, wurden Versuche unternommen, diese für Trennungen von Alkoholen als wirksam erkannte Substanz in der Kombination mit Diglyzerin anzuwenden. - Die Kombination von Säule 13 (Beladung: je ca. 13% Diglyzerin und Oxydipropionitril auf Sterchamol) und Säule 3 (Beladung: 20% Diglyzerin/Sterchamol) zeigte aber keine Verbesserung der auf Säule 8 erzielten Trennungen. Auch hier erschienen Methanol und Aethanol als Doppelzacke, während die übrigen Alkohole gut getrennt waren. Bei Verwendung der Säule 13 allein trat ebenfalls die Zacke auf. - Eine Verlängerung der Säule 13 (Säule 22: Länge 3 m, Beladung: je 15% Diglyzerin und Oxydipropionitril auf Sterchamol), sowie eine Verminderung des Diglyzerinanteils in Säule 23 (Länge ebenfalls 3 m) erbrachten keine Trennungsverbesserungen; die Retentionszeiten waren außerdem bei beiden Säulen sehr lang, z.B. t_R für iso-Amylol: 17'47" (gemessen auf Säule 23, Thermostatentemp.: 100° C, $p_c = 1,5$ atü). Die Auftrennung von Aethanol und sek.-Butanol war lediglich in Form zweier flacher, dicht aufeinander-

der folgender Zacken angedeutet und das Gemisch der acht unteren aliphatischen Alkohole somit nur in 4 Zacken aufgetrennt. - Nach einer weiteren Heraufsetzung des Oxydipropionitrilgehaltes bei der Kombination von Säule 13 und Säule 5 (Beladung: 30% Oxydipropionitril/Sterchamol) war das Wasserrückhaltevermögen nicht mehr ausreichend. - Eine Kombination von Säule 8 (Beladung: je 15% Diglyzerin u. Polyglykol/Sterchamol) und Säule 6 (Beladung: 30% Dinonylphthalat auf Sterchamol) sowie eine Kombination von Flexol 8N8, Oxydipropionitril und Diglyzerin (Säulen 13 u. 15) ergaben ebenfalls keine besseren Auftrennungen.

Da sich mit Hilfe der geprüften Kombinationssäulen keine Verbesserung auf der Säule 8 erzielten Ergebnisse erreichen lassen, sollte die Trennung der unteren aliphatischen Alkohole dadurch erzielt werden, daß 2 Kolonnen verwendet wurden, von denen die eine (Säule 8) den größten Teil der Alkohole auftrennte, während eine zweite Kolonne Methanol und Aethanol von einander abgrenzte.

Da die Kolonne Nr. 70025 (Alkohol-Kolonne, Fa. Beckman) Lösungen der niedrigen aliphatischen Alkohole in organischen Solventien ausgezeichnet auftrennte (Chromatogr. 1), wurde der Hauptbestandteil der Kolonne, das Flexol 8N8, als Hauptsubstanz gewählt. Als Wasser selektiv zurückhaltende Substanz wurde wieder Diglyzerin zugesetzt (Säule 16, Länge: 1,5 m, Beladung: 5% Diglyzerin, 25% Flexol 8N8, beides auf Sterchamol). Diese Versuchskolonne erwies sich jedoch als zu kurz, daher waren Trennvermögen und Wasserretention unzureichend. Die Säule wurde deshalb zunächst mit Säule 15 (Länge: 1,55 m, Beladung: 30% Flexol 8N8), gekoppelt. Hier war die Auftrennung der reinen Substanzen ausgezeichnet. Bei der Injektion von wäßriger Lösung war die Auftrennung von Methanol und Aethanol jedoch nur durch "Buckelbildung" angedeutet, ein Zeichen, daß die Säule infolge ihres geringen Diglyzeringehaltes trotz ausreichender Länge bereits überladen war. Deswegen wurde Säule 16 mit einer anderen, ebenfalls Diglyzerin und Flexol enthaltenden Kolonne 17, (Länge 3 m, Beladung: 2,5% Diglyze-

rin, 26,5% Flexol 8N8) gekoppelt. Die Retentionszeit des Wassers war bedeutend verlängert und die Säulenkombination selbst mit Probemengen bis zu 50 µl belastbar. Um diese Trennung noch weiter zu verbessern wurde eine gemeinsame Imprägnierung in ähnlichem Mengenverhältnis hergestellt: Säule 21 (Länge 3 m, Beladung: 3,75% Diglyzerin, 26,1% Flexol 8N8). Der Diglyzeringehalt wurde hierbei gleichzeitig noch etwas vermindert, da erwartet werden konnte, daß bei der Länge der Säule die Retention von Wasser ausreichen würde. Chromatogr. 7 zeigt die ausgezeichnete Trennung der vier Alkohole, Wasser wurde völlig ausreichend zurückgehalten. Die Säule war bei Einzelanalysen sogar bis zu Probemengen von 100 µl belastbar, allerdings sollte eine Probemenge von 50 µl bei Routineanalysen nicht überschritten werden, da sonst die Gefahr der Überladung der Säule besteht.

Die Nachweisgrenze lag für Aethanol und Isopropanol bei 0,15 Gamma bei maximal belastetem Detektor (400 mA) und 50 µl Probe. Sie konnte durch Temperaturerhöhung auf 130° C noch um das Dreifache gesteigert werden.

Die Dauer einer Analyse war mit 45 Minuten jedoch recht lang. Durch Verkürzung der Säule sollte versucht werden, die Dauer der Analysen, sowie die Retentionszeiten der Alkohole zu vermindern. Deshalb wurde eine neue Säule 21 mit nur 2,1 m Länge angefertigt. Die Belastbarkeit war auf ca. 50 µl herabgesunken, aber die Trennungen blieben ausgezeichnet erhalten. Die Analysenzeit war auf 25 Minuten verkürzt. Für die schnelle Analyse mit Alkohollösungen etwas größerer Konzentration war diese Säule ausgezeichnet geeignet.

Um die Trennung von Methanol, Aethanol und Isopropanol noch weiter zu verbessern, wurde der Diglyzeringehalt noch einmal herabgesetzt und die Säule 24, (Länge 3m; Beladung: 2,5% Diglyzerin, 27,5% Flexol 8N8; inerter Träger: Sterchamol) angefertigt. Diese Säule war bis zu 30 µl mit Wasser belastbar.

Die Trennung der 3 niedrigen aliphatischen Alkohole entsprach fast der auf einer reinen Flexolkolonne, n-Propanol lag bei dieser Säule bereits in der Wasserzacke.

Die Retentionszeiten von Methanol, Aethanol, Isopropanol und n-Propanol auf den Säulen 21 (Länge: 3 m bzw. 2,1 m) und 24, sowie das Wasserrückhaltevermögen dieser Kolonnen gibt Tab. 9 wieder.

Tabelle 9

Substanz	Säule 21 (3 m)	t_R auf	
		Säule 21 (2,1 m)	Säule 24
Methanol	3'38"	2'8"	3'50"
Aethanol	4'53"	2'31"	5'2"
Isopropanol	5'42"	2'50"	5'45"
n-Propanol	9'34"	bereits innerhalb der Wasserzacke	
Wasser	Beginn 11'	3'30"	6'55"
	t_R 14'	4'10"	9'30"
Probemenge	50 μ l	30 μ l	30 μ l

Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100° C

fc: 1,5 atü = 185 ml H_2 /Min.

Probe: 20 μ l wäßriger Lsg. ca. 2 ‰ der Substanzen enthaltend

Detektorstrom: 300 mA

Erwähnt sei noch, daß eine Kombination von Sebacinsäureaethylhexylester, Flexol 8N8 und Diglyzerin (Säule 19 u. 20) keine besseren Ergebnisse als die auf Säule 21 u. 24 erzielten Trennungen brachte.

V. E) Vorschläge für ein Routineverfahren mit der Kolonne Nr. 70025 (Alkoholkol. Fa. Beckman).

Das Hauptproblem für ein gaschromatographisches Blutalkohol-Routineverfahren ist die rasche Eliminierung des Wassers.

Die bisherigen Versuche hatten zur Herstellung von Kolonnen geführt, die für die Analyse der unteren aliphatischen Alkohole im wäßrigen System geeignet waren. Für ein Routineverfahren waren diese Säulen jedoch nicht brauchbar, da wegen ihrer hohen Selektivität für Wasser zu lange Analysenzeiten resultierten. Eine wesentliche Verkürzung der Analysenzeit konnte nur erzielt werden, wenn das Wasser nicht die ganze Länge der Kolonne passieren mußte. Deshalb sollte die Selektivität der Kolonne Nr. 70025 (Alkoholkol. Fa. Beckman) für Wasser durch eine Diglycerinvorkolonne gesteigert werden und die Vorkolonne durch Hahnumstellung nach dem Passieren des Aethanols und vor Übertritt des Wassers in die Hauptkolonne aus dem Gasfluß ausgeschaltet werden. Nach der Registrierung der Aethanolzacke sollte das in der Vorsäule zurückgehaltene Wasser durch Rückspülen wieder herausgetrieben werden.

Das Problem lag in der genauen Bemessung der Vorkolonne, die gerade nur so lang sein durfte, daß die gewünschte Retention des Wassers erreicht war. Zu große Mengen an Diglycerin mußten die Trennung verschlechtern. Denn die Kolonne Nr. 70025 trennt die Alkohole (s. Chromatogr. 1) in der Reihenfolge der Siedepunkte auf, während bei Verwendung einer Diglycerin-Kolonne Methanol mit n-Propanol zusammen hinter Aethanol eluiert werden und das höhersiedende Isopropanol vor Aethanol durchbricht. Eine zu lange Diglycerin-Vorsäule mußte sowohl die Zacke des Methanols als auch die des Isopropanols zu nahe an die Aethanolzacke heranrücken, so daß die Trennwirkung der Kolonne Nr. 70025 (Fa. Beckman) beseitigt worden wäre.

Um diesen Einfluß zu demonstrieren, wurde die Säule 7 (Län-

ge: 1,6 m; Beladung: 30% Diglycerin/Sterchamol) vor die Kolonne Nr. 70025 geschaltet. Die 3 Alkohole erschienen tatsächlich als eine Zacke. Auch bei einer 0,75 m langen Vorsäule mit 30% Diglycerin/Sterchamol brachen Aethanol und Isopropanol noch als Doppelzacke durch, während Methanol bereits wieder abgetrennt war und vor der Doppelzacke erschien. Bei einer 0,4 m langen Vorsäule war die Trennung für Proben der 3 Alkohole in organischer Lösung, sowie für kleinere wäßrige Probemengen wieder hergestellt.

Es war ermittelt worden, daß wegen der durch die Vorsäule verlängerten Retentionszeiten und der verminderten Schärfe der Zacken Probemengen von rd. 50 µl nötig waren, um auch für Lösungen mit Gehalten von 0,1 - 0,5 %o Aethanol Zacken in ausreichender Höhe zu erhalten. Wurden jedoch auf die Kombination der Kolonne Nr. 70025 mit der 0,4 m langen Diglycerin-Vorkolonne Probemengen von 30 µl wäßriger Lösungen aufgegeben, so fiel der Beginn der Wasserzacke mit der Retentionszeit des Aethanols zusammen. Weiterhin konnte beobachtet werden, daß der Beginn des Wasserpeaks erst beträchtlich später lag, wenn die Probemenge auf 5 µl reduziert wurde. Diese Tatsache sollte sich für die Bereitung der Vorsäule 31a (Länge: 0,4 m, Beladung: 7,5% Diglycerin/Sterchamol) als wichtig erweisen.

Eine Vorsäule von 0,5 m Länge durfte bei der benötigten Probemenge von 50 µl nicht unterschritten werden, wenn das Wasserretentionsvermögen nicht unzureichend werden sollte. Bei dieser Länge der Vorkolonne war jedoch die Trennung zwischen Methanol, Aethanol und Isopropanol nicht ausreichend, wodurch die Spezifität des Verfahrens entscheidend vermindert worden wäre.

Sollte die Trennleistung der Kolonne Nr. 70025 dennoch für ein Routineverfahren nutzbar gemacht werden, so gab es 3 Möglichkeiten:

- 1) Es mußte die Hauptkolonne verlängert werden, um die für die Trennung benötigte höhere Bodenzahl zu erhalten.
- 2) Es war eine andere wasserzurückhaltende Substanz in der Vorkolonnen zu verwenden, deren Einfluß auf die Trennung geringer war.
- 3) Es schien aussichtsreich, durch Herabsetzung der Länge und Beladung der Vorsäule mit kleineren Probemengen gute Trennungen zu erzielen. Dafür war jedoch ein wesentlich empfindlicherer Detektor unentbehrlich.

Zunächst wurde die Kolonne Nr. 70025 durch Kopplung mit der Säule 15 (Länge: 1,55 m; Beladung: 30% Flexol 8N8/Sterchamol) verlängert und eine 0,5 m lange Diglyzerinkolonnen (Beladung: 30%) davorgeschaltet. Das Wasserrückhaltevermögen war erwartungsgemäß ausreichend, die Retentionszeiten jedoch sehr lang. (t_R Aethanol: 7'18"; t_R Isopropanol: 8'17" bei Thermostaten-Temp.: 100° C; f_c = 1,5 atü). Zusammen mit der notwendigen Rückspülung des Wassers wäre die Analysenzeit zu lang geworden. Eine Änderung der Versuchsparameter (Erhöhung der f_c und der Temperatur) führte zwar zu verkürzten Retentionszeiten, hatte aber eine Trennungsverschlechterung zur Folge.

Da auch Polyglykol ein beträchtliches Rückhaltevermögen gegen Wasser besitzt, sollte untersucht werden, ob nicht durch eine solche Vorkolonnen die Trennleistung der Kolonne Nr. 70025 besser erhalten werden konnte. Deshalb wurde eine 0,6 m lange Vorkolonnen hergestellt, die auf Sterchamol als inertem Träger 30% Polyglykol 1000 enthielt. Aber auch bei dieser Säulenkombination wurden Aethanol und Isopropanol gemeinsam eluiert.

Da bei den Versuchen mit der Kolonne Nr. 70025 und einer Diglyzerin-Vorkolonnen kein Kompromiß bei der Bemessung der Vorsäulenlänge gefunden werden konnte, eine Polyglykol-Vorsäule wegen ihrer geringen Wasserretention und ihrer trennungsvermindernden Eigenschaft ungeeignet war, und auch verschiedene Vorsäulen mit Füllungen unterschiedlicher Mischungs-

verhältnisse von Diglyzerin und Polyglykol zu langen Retentions- und Analysenzeiten führten, sollte von der aufgezeigten dritten Möglichkeit Gebrauch gemacht werden.

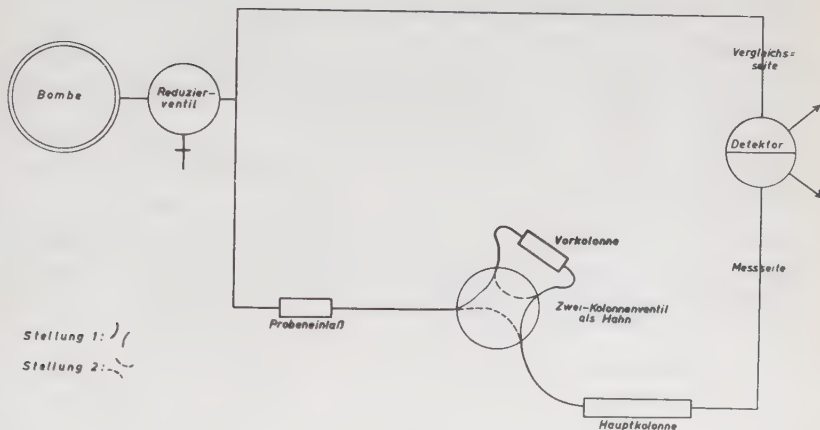
Die für die Anwendung des letztgenannten Verfahrens notwendige Verkleinerung der Probemenge war zwangsläufig mit einer empfindlichen Verringerung der Nachweisempfindlichkeit verknüpft. Da zunächst kein empfindlicherer Detektor zur Verfügung stand, konnten die folgenden Versuche nur Voruntersuchungen sein.

Die Länge der Vorsäule und die Konzentration an Diglyzerin wurden reduziert und die Säule 31a (Länge: 0,4 m, Beladung: 7,5% Diglyzerin) vor die Kolonne Nr. 70025 geschaltet. Zwischen Haupt- und Vorsäule wurde ein Zwei-Kolonnen-Ventil (Fa. Beckman) so eingefügt, daß damit die Vorsäule aus dem Gasstrom ausgeschaltet werden konnte. (Graphik 8) Chromatogr. 8 zeigt die nur geringfügig verminderte Trennung, die Retentionszeiten waren ebenfalls kurz: Methanol: 2'51"; Isopropanol: 3'18"; n-Propanol: 5'35". (Bedingungen: Thermostatentemp.: 100° C, $p_c = 1,25$ atü). Die Säule konnte allerdings nur bis zu 10 μ l Wasser beladen werden. Der Beginn der Wasserzacke lag für 5 μ l wäßriger Lösung bei 4'25"; die t_R bei 4'40".

Sodann wurde ermittelt, nach welcher Zeit der Hahn umzuschalten war (von Stellung 1 auf Stellung 2 in Graphik 8), um eine vollständige Zurückhaltung des Wassers in der Vorsäule mit hoher Sicherheit zu gewährleisten. Das Aethanol sollte zu diesem Zeitpunkt bereits quantitativ in die Hauptsäule übergetreten sein. Die Umschaltung des Hahnes nach einer Minute bewirkte die Zurückhaltung des Wassers in der Vorsäule und die quantitative Erfassung des Aethanols, wie sich aus Vergleichsanalysen ergab. Das Wasser ließ sich dann mit Hilfe der Rückspülvorrichtung in ca. 8 Minuten wieder entfernen, so daß eine einzelne Bestimmung nur ca. 11 Minuten in Anspruch nahm.

GRAPHIK 8

Schaltbild der Apparatur
bei Verwendung einer Vorkolonne und eines Zwei-Kolonnenventils.



Größere Probemengen als 5 μ l zu injizieren, war jedoch nicht möglich, da dann trotz Betätigung des Hahnes nach einer Minute eine Wasserzacke kurz nach der Aethanolzacke durchbrach. Dies war ein Zeichen, daß die Vorsäule wegen ihrer geringen Belastung mit nur 7,5% flüssiger Phase bereits überladen war. Für eine derartig geringe Probemenge war aber der Wärmeleitfähigkeitsdetektor nicht empfindlich genug, denn die Injektion von 5 μ l Probe einer Lösung von 0,8 ‰ Aethanol ergab bei fast max. Ausnutzung des Detektors (380 mA), nur eine Zackenhöhe von 2,4 cm. Daraus errechnete sich eine Nachweismöglichkeit von lediglich 0,15⁰/100 Aethanol, dieser Wert war für ein Routineverfahren viel zu klein. Um das Verfahren weiter entwickeln zu können, hätte es eines Detektors mit 5 - 10facher Empfindlichkeit bedurft. Da der Flammenionisationsdetektor

noch nicht zur Verfügung stand, mußte die Erprobung des Verfahrens zurückgestellt werden. Inzwischen wurden die anderen Versuchsparameter, sowie die Reproduzierbarkeit eines gaschromatographischen Blutalkohol-Verfahrens an einer anderen Säulenkombination untersucht (Abschnitt V.F).

Als Ergebnis der Voruntersuchungen konnten die noch unvollständigen günstigsten Arbeitsbedingungen wie folgt zusammengefaßt werden:

Vorkolonnen: Säule 31a (Länge: 0,4 m, Beladung: 7,5% Diglyzerin-Sterchamol).

Hauptkolonne: Kolonne Nr. 70025 (Alkoholkolonne Fa. Beckman).

Umstellung des Hahnes: von Stellung 1 auf Stellung 2 (Graphik 8) 1 Min. nach Injektion.

Rückspülzeit: Ca. 8 Minuten bei $f_c = 1,25$ atü, ca. 5 Minuten bei $f_c = 2$ atü.

Probemenge: 5 µl wäßrige Lösung.

Injektion: Mit Beckman- oder Hamilton-Mikrospritze.

Detektor: Flammenionisationsdetektor oder empfindlicherer Wärmeleitfähigkeitsdetektor

f_c : 1,25 atü = 143 ml H_2 /min.

Trärgas: Wasserstoff.

Retentionszeiten:	t_0 :	36'
	Methanol:	2'7"
	Aethanol:	2'51"
	Isopropanol:	3'18"
	n-Propanol:	5'35"
	Wasser Beginn:	4'45"
	t_R :	4'40"

V.F) Vorschläge für ein Routineverfahren mit einer Diglyzerin-
kolonne.

1) Wahl der Säulen-Kombination.

Da die Untersuchungen für ein Routineverfahren mit der Kolonne Nr. 70025 und der Vorsäule 31a wegen des unzureichenden Detektors nicht weitergeführt werden konnten, wurde zur Lösung des Problems auf eine bereits erprobte Säule zurückgegriffen. Die Diglyzerin-Kolonne 7 (Länge: 3 m; Beladung: 30% Diglyzerin/Sterchamol) war, wie die Überprüfung ergeben hatte, ebenfalls in der Lage, Aethanol von Substanzen mit ähnlichen Retentionswerten abzutrennen. Diese Säule wurde in eine Vorkolonne von 1 m Länge (Vorsäule 31) und eine 2 m lange Hauptkolonne aufgeteilt. Dazwischen wurde wieder das als Hahn geschaltete Zwei-Kolonnenventil (Fa. Beckman) angebracht. Mit dieser Kombination war die Abtrennung des Aethanols von Methanol, Isopropanol und n-Propanol ausgezeichnet, jedoch waren die Retentionszeiten wegen der Länge der Säule noch etwas hoch: t_R für Methanol: 9'4"; t_R für Aethanol: 7'50" (Thermostatentemp.: 100° C; $p_c = 1,45$ atü). Eine Erhöhung des Trägergasdruckes zur Erzielung kürzerer Retentionswerte kam wegen der Verschlechterung der Trennung und des Absinkens der Zackenhöhe nicht in Frage. Eine Temperaturerhöhung auf 130° C - 160° C zog ebenfalls eine bedeutende Verminderung der Trennung nach sich. Außerdem lag eine Temperatur von 130° C bereits nahe an der Temperaturgrenze des Diglyzerins. Für ein Routineverfahren ist dies nicht tragbar, weil eine Veränderung der Säulen-Charakteristik durch Abdampfen der flüssigen Phase nicht eintreten darf. Deshalb mußte die Retentionszeit auf andere Weise gesenkt werden. Dies konnte durch eine Verminderung der Beladung erreicht werden.

MARTIN (82) berichtete über den starken Einfluß der Verminderung der Beladung auf das Retentionsvolumen. NICOLAIDES (83) erreichte durch Senkung der Konzentration der flüssigen Phase

von 25 auf 5% eine Verkürzung der Retentionszeit auf $1/3$ bei gleichbleibender Trennung.

Deshalb wurde eine neue Säule 25 (Länge: 2,1 m) angefertigt, die nur eine Beladung von 10% Diglyzerin auf Sterchamol enthielt. Als Arbeitsbedingungen wurden eine Thermostaten-Temp. von 100°C und ein Säulenvordruck von 1,4 atü gewählt, die Retentionszeiten von Methanol und Aethanol betrugen dabei 6'15" und 5'30". Die Verminderung der Beladung der Hauptsäule brachte also eine Ersparnis von rund 2 1/2 Minuten Analysenzeit.

Zusammen mit der Vorsäule 31 (Länge 1 m; Beladung: 30% Diglyzerin auf Sterchamol) wurde die Säule 25 für das nun zu besprechende Routineverfahren verwendet.

V.F, 2) Spezifität des Verfahrens.

Bei der letztgenannten Säulenkombination waren, verglichen mit Säule 7 (Länge: 3 m; Beladung: 30% Diglyzerin/Sterchamol) die Zacken von Methanol und n-Propanol etwas näher an die Aethanolzacke herangerückt. Die Abtrennung der beiden Substanzen von Aethanol war nicht mehr möglich, sofern hohe Konzentrationen der Substanzen vorlagen und auch bei höheren Konzentrationsunterschieden als 1 : 5. In wäßrigen Lösungen mit kleineren Alkoholkonzentrationen war die Trennung völlig ausreichend. Das Verfahren wurde auf seine Spezifität für Aethanol durch Überprüfung der Retentionswerte von insgesamt 38 flüchtigen Substanzen untersucht (s. auch Abschn. VI).

Wie aus der Tabelle 14 hervorgeht, kommen als Substanzen mit benachbarten Retentionszeiten nur Isopropanol, sek.-Butanol, und evtl. n-Propanol in Frage. Die Abtrennung von n-Propanol, iso-Propanol und Methanol zeigt Chromatogr. 9. Leider ließ sich bei dieser Säulenkombination keine Trennung des Aethanols von iso-Butanol, dagegen eine solche von sek.-Butanol erzielen. Die identischen Retentionswerte von Aethanol und

iso-Butanol schränken die Spezifität des Verfahrens naturgemäß ein; da iso-Butanol jedoch keine Substanz von größerem toxikologischem Interesse ist, konnte diese Einschränkung hingenommen werden.

V.F, 3) Optimale Bedingungen für die Funktion der Vorsäule.

Um optimale Verhältnisse für die Abtrennung des Wassers zu erhalten, mußte der Zeitpunkt der Ausschaltung der Vorsäule aus dem Gasstrom ermittelt werden. Deshalb wurde die Hauptkolonne entfernt und die Vorkolonne durch ein kurzes Rohr unmittelbar an den Detektor angeschlossen, um das Passieren der Substanzen zeitlich genau kontrollieren zu können. Nun wurden mehrere Male jeweils 5 µl Aethanol oder 50 µl Wasser injiziert. (Tab. 10)

Tabelle 10

	Beginn der Zacke	t_R	Ende der Zacke	Probemenge
Aethanol	50"	1'	2'	5 µl
Wasser	6'7"	7'30"	28'	50 µl

Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100° C

$f_c = 1,4$ atü.

Nach diesem Ergebnis könnte die Umschaltung auch bei der gewählten hohen Aethanoldosis bereits nach dem Ende der Aethanolzacke nach 2 Minuten erfolgen. Um die Sicherheit der Alkoholbestimmung jedoch noch weiter zu erhöhen wird vorgeschlagen, erst nach 3 Minuten umzuschalten. Würde erst nach der Registrierung der Aethanolzacke umgeschaltet, so könnten zwar Schwankungen der Null-Linie vermieden werden, der Zeitpunkt läge jedoch zu nahe am Beginn der Wasserzacke. Außerdem würde dann das Wasser noch tiefer in die Vorsäule eindringen und eine längere Rückspülzeit erfordern.

Nach Registrierung der Aethanolzacke wurde die Rückspülvorrichtung betätigt, der Hahn erneut umgestellt, der Probeneinlaß freigegeben und das Wasser nach Druckerhöhung auf 2 atü zurückgespült. Es galt nun, die optimale Rückspülzeit für wäßrige Proben von 50 μ l zu finden. Wurden Einlauf- und Rückspülzeit gleich gewählt (im Versuch 3 Minuten), so kam erwartungsgemäß eine Wasserzacke, die einem Drittel der Höhe der ursprünglich injizierten Wassermenge entsprach, obwohl die Zeit theoretisch ausreichen sollte, das Wasser durch Rückspülen zu entfernen. Wurde eine Wassermenge von 50 μ l injiziert, nach 7 Minuten umgestellt und dann 12 Minuten mit einem Druck von 1,5 atü zurückgespült, so erschien nach Freigabe der ursprünglichen Richtung ebenfalls eine größere Wasserzacke. Bei Erhöhung des Rückspüldruckes auf 2 atü war der Peak unter den gleichen Bedingungen beträchtlich kleiner. Wurde nach 2 Minuten umgestellt und 12 Minuten bei einem Druck von 2 atü rückgespült, so gelang die Eliminierung des Wassers vollständig. Daraus war zu schließen, daß es ratsam war, den Rückspüldruck höher zu wählen, als den Arbeitsdruck, und daß bei einer langen Einlaufzeit relativ viel länger zurückgespült werden muß, als nach einer kurzen. Bei einer Einlaufzeit von 2 - 3 Minuten reichte der 3-4fache Betrag an Rückspülzeit bei erhöhtem Druck aus. Bei längerer Einlaufzeit von 5-6 Minuten mußte die Rückspülzeit bei erhöhtem Druck das 6-7fache der Einlaufzeit betragen. Deshalb wurde bei einer Einlaufzeit von 3 Minuten und einem Säulenvordruck von 1,4 atü eine Rückspülzeit von 12 Minuten bei einem Druck von 2 atü gewählt.

Die lange Rückspülzeit ist nur für Wasser erforderlich und gilt für fast alle Säulen, gleichgültig welcher Polarität. Die Versuche wurden mit Säule 22 (Länge: 3 m; Füllung: je 15% Diglyzerin u. Oxydipropinitril/Sterchamol) wiederholt, wobei trotz geringerer Polarität sowie kleinerem Diglyzerin-gehalt fast der gleiche Zeitaufwand für die Rückspülung erfor-

derlich war, wie bei der Diglyzerinkolonne. Wurden dagegen 50 μ l des beträchtlich schwerer flüchtigen iso-Amylols injiziert, so war der doppelte Betrag der Einlaufzeit für die Rückspülung in jedem Falle ausreichend. Außerdem brauchte der Rückspüldruck nicht einmal höher zu sein.

V. F, 4) Optimale Bedingungen für Probegröße und Detektorstrom (Reinigung der Spritze, Aussalzeffekt).

Zur Wahl standen entweder eine Probemenge von 40 μ l und ein Detektorstrom von 400 mA oder eine etwas höhere Probemenge von 50 μ l und ein niedrigerer Detektorstrom von 380 mA. Bei noch niedrigeren Detektorströmen oder Probemengen wären die Peakhöhen zu klein geworden, so daß die Auswertbarkeit der Chromatogramme und die Nachweisempfindlichkeit beeinträchtigt worden wären. Da die Vorsäule ohne weiteres mit 50 μ l belastbar war, und die Dauerbelastung des Detektors wegen der Empfindlichkeit der Wolframdrähte mit möglichst niedrigen Strömen erfolgen soll, wurde mit einem Detektorstrom von 380 mA und einer Probemenge von 50 μ l gearbeitet.

Da zur Injektion nur eine Microspritze der Fa. Beckman zur Verfügung stand, war zu klären, wie oft eine neue Lösung aufgesogen und wieder ausgestoßen werden mußte, um die alte Analysenlösung restlos zu eliminieren. Die Überprüfung wurde mit einem Serum mit einem Aethanolgehalt von 5 % vorgenommen. Diese verhältnismäßig hohe Konzentration wurde gewählt, um eine hohe Sicherheit zu erhalten. Die Untersuchung ergab, daß 7-8mal reines Wasser aufgezogen und wieder ausgestoßen werden mußte, ehe die ursprüngliche Lösung völlig entfernt und die Aethanolkonzentration auf Null abgesunken war.

Steht nur eine geringe Probemenge zur Verfügung, so daß ein mehrmaliges Aufziehen der Lösung nicht möglich ist, so muß der Kolben mit dest. Wasser ausgespült und getrocknet werden und dann die zu untersuchende Lösung blasenfrei aufgezogen werden.

Da zur Enteiweißung beträchtliche Mengen Bleinitrat zugesetzt werden müssen, so daß die Bleinitratkonzentration im Zentrifugat ca. 13% beträgt, war die Frage zu prüfen, ob nicht ein Aussalzeffekt für organische Substanzen auftrat, der die quantitative Bestimmung beeinflussen konnte. Deshalb wurde ein Serum mit ca. 1,7% Aethanol mit steigenden Bleinitrat-Mengen versetzt, zentrifugiert und nach der Injektion die Peakhöhe ausgemessen. Wie aus der Tabelle 11 hervorgeht, lagen die Peakhöhen zunächst innerhalb der normalen Streubreiten und sanken erst mit stark zunehmenden $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -Konzentrationen zu etwas niedrigeren Werten ab. Hieraus konnte geschlossen werden, daß kein Aussalzeffekt auftrat und ferner die zugegebene $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -Menge nicht jedesmal abgewogen zu werden brauchte, sondern die Dosierung auch mittels eines einfachen Meßlöffels erfolgen kann. Dies erspart Arbeit und Zeit.

Tabelle 11

Menge an $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ zu 2ml Serum	Peakhöhe in cm
180 mg	19.25
220 "	19.35
260 "	19.3
340 "	19.10
400 "	19.05
520 "	18.85

Bedingungen: s. Abschn. V.F,5)

V.F,5) Zusammenfassung der ermittelten günstigsten Arbeitsbedingungen.

Vorsäule: Säule 31; Länge: 1m; Füllung: 12,4 g Sterchamol mit 30% Diglycerin, entsprechend 3,72 g Diglycerin.

Hauptsäule: Säule 25; Länge: 2,1 m; Füllung 20,5 g Sterchamol mit 10 % Diglycerin, entspr. ca. 2 g Diglycerin.

Thermostaten-Temperatur: 100° C.

Detektorstrom: 380 mA.

Empfindlichkeit: 1x - 5x.

fc: 1,4 atü = 165 ml/H₂/min. (Gesamtfluß durch Meß- und Referenzzelle des Detektors).

Probemenge: 50 µl wäßrige Lösung.

Umstellung des Hahnes: 3 Minuten nach Injektion.

Rückspülzeit: 12 Minuten bei 2 atü.

Retentionszeiten: t₀: 42''

Aceton: 1'55''

Aethanol: 5'30''

Methanol: 6'18''

Injektion: Mit Beckman-Mikrospritze, Abstandszylinder 50 µl in Verdampfungskammer (s. Abschn. V.B). Zwischen den Analysen 6-8malige Spritzenreinigung.

Papiervorschub des Schreibers: 1/2 inch/min., d.h. rund 1 1/4 cm/min.

Enteiweißung des Serums: Zugabe von 130 mg Pb(NO₃)₂/ml.

Zentrifugieren: 10 Minuten bei 5000 U/min.

Auswertung: Zackenhöhenmethode über Eichkurve (doppelte graphische Entnahme aus dem Chromatogramm).

V.F,6) Quantitative Auswertung und Eichkurven.

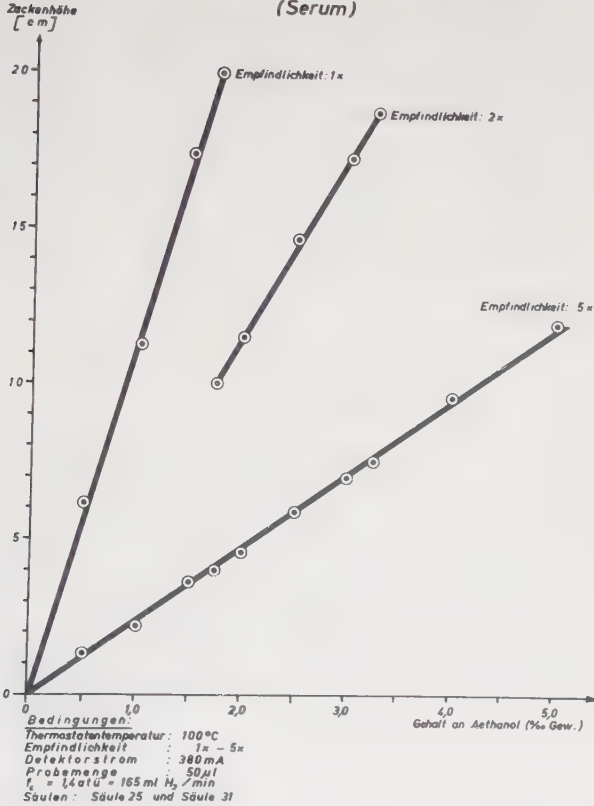
Die einzige Quelle zur quantitativen Auswertung in der Gaschromatographie ist die Zacke. Einen Überblick über die verschiedenen Methoden der Auswertung der Zacken geben KAISER (1), BAYER (2), KEULEMANN (3), sowie HAUSDORFER (84), AMBROSE et al. (85) und FUSS (86). JANAK (87) untersuchte die Fehler der quantitativen Auswertungsmethoden. Am besten bewährte sich die Anwendung eines elektrischen Integrators, wobei die Fehler unter ± 1% lagen. Die gebräuchlichsten Verfahren sind die Auswertung nach der Höhe und Fläche der Zacke.

Die Fläche wird dabei näherungsweise aus $h \times b$ errechnet, wobei h die Zackenhöhe und b die Breite der Zacke in halber Höhe ist. Obwohl die Zackenfläche (s. Abschn. II, 4) gegenüber Schwankungen der Versuchstemperatur unempfindlicher ist, als die Höhe der Zacke, wurde bei allen Versuchen nach der Zackenhöhen-Methode ausgewertet. Voraussetzung dafür ist Konstanz der Versuchsparameter, vor allem der Thermostaten-temperatur. Die Methode der Ausmessung der Zackenhöhe bietet besondere Vorteile bei scharfen Zacken, da bei diesen die Ausmessung von b für die Flächenmethode wegen der Kleinheit von b große Fehler mit sich bringt. Die Höhenmethode ist einfacher und sicherer, da nur einmal gemessen werden muß, und eine Ausrechnung entfällt. Die graphische Entnahme der Zackenhöhen aus dem Chromatogramm soll doppelt erfolgen, um Fehler möglichst auszuschließen.

Das für die Aufstellung der Eichkurve benötigte Serum wurde zunächst gaschromatographisch auf die Abwesenheit flüchtiger Substanzen überprüft. Zur Erhöhung der Sicherheit wurden 2 Eichkurven aufgestellt und zwei genau 5%o Aethanol enthaltende Stammlösungen mit Serum hergestellt. Dazu wurden jeweils 0,5 g absoluter Alkohol genau gewogen und mit Humanserum in einem geeichten 100 ml Kolben aufgefüllt. Aus dem einen Ansatz wurden die entsprechenden Aethanol-Konzentrationen durch Verdünnen mit Serum hergestellt und jeweils 2 ml Serum für die Bestimmung verwendet. Vom Zentrifugat wurden stets 50 μ l Probe entnommen. Von der 2. Stammlösung wurde eine größere Menge mit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ enteiweißt und aus dem Zentrifugat wurden steigende Probemengen von 5 - 60 μ l entnommen. Die Übereinstimmung bei den Eichkurven war ausgezeichnet. Das beweist, daß der Detektor auf absolute Mengen anspricht und die Auftrennung an der Säule weitgehend unabhängig von der Probemenge ist. Für die weiteren Versuche wurde diejenige Eichkurve verwendet, bei der stets 50 μ l Probe aus dem Zentrifugat von 2 ml Serum verwendet worden war (Graphik 9, Tab. 12).

GRAPHIK 9

**Aethanol - Eichkurve
(Serum)**



Die Werte für die Eichkurve streuen naturgemäß etwas, die Streuungen sind aber in Anbetracht der Fehlermöglichkeiten (s. Abschn. V.F,12) erstaunlich gering.

Tabelle 12

Gehalt des Serums in Gew. %	Zacken- höhe (Mittel- wert)	Empfind- lichkeit
0.5	6.06 cm	1x
0.75	8.3 "	"
1.0	11.3 "	"
1.5	17.4 "	"
1.75	20.0 "	"
2.0	11.5 "	2x
2.5	14.63 "	"
3.0	17.35 "	"
3.25	18.8 "	"
4.0	23.15 "	"
5.0	12.1 "	5x

Tabelle 13

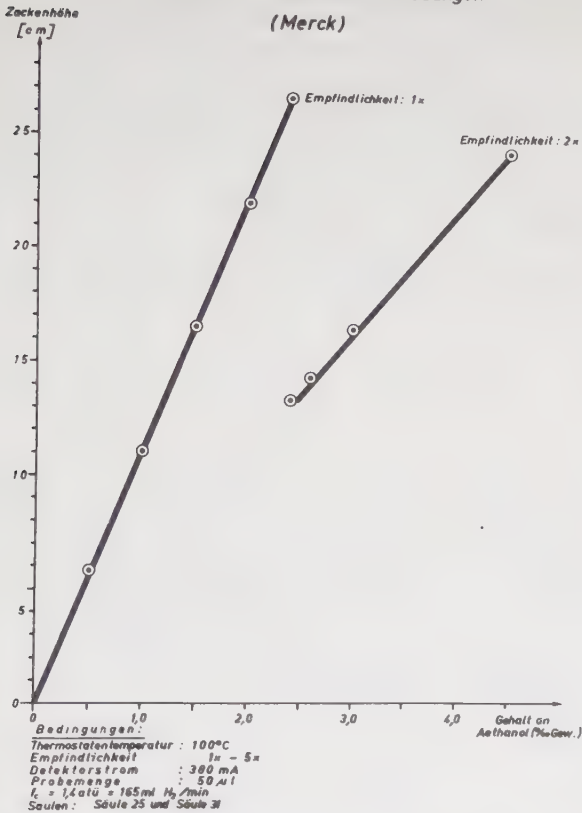
Testlö- sung Merck in %	Zacken- höhe (Mittel- wert)	Empfind- lichkeit
0.5	5.75 cm	1x
1.0	11.07 "	"
1.5	16.6 "	"
2.0	21.95 "	"
2.4	13.35 "	2x
2.6	14.3 "	"
3.0	16.45 "	"
4.5	21.2 "	"

Bedingungen: s. Abschn. V.F,5).

Um die Konstanz der Versuchsparameter dauernd überwachen zu können, wurde gleichfalls eine Eichkurve mit wäßrigen Alkohol-Testlösungen (Fa. Merck) aufgenommen (Graphik 10, Tab. 13). Bei den Untersuchungen wurden täglich zwei Testlösungen unterschiedlichen Gehaltes injiziert, und die Analysenwerte danach falls notwendig korrigiert. Die Werte für die Merck'schen Testlösungen streuten weniger als die Werte für die Eichkurve mit Serum, obwohl auch hier eine entsprechende Menge Bleinitrat hinzugesetzt worden war, um möglichst gleiche Bedingungen zu erhalten. Die Aethanol-Werte für die wäßrigen Testlösungen lagen durchschnittlich um 5% niedriger, was durch den Enteiweißungsprozeß und die damit verbundene Verschiebung des Aethanols in die wäßrige Phase erklärt werden kann.

GRAPHIK 10

**Eichkurve für Aethanol-Testlösungen
(Merck)**



V.F,7) Streuung der gaschromatographischen Bestimmungen.

Die Genauigkeit der Alkoholbestimmungen wurde mit aethanolhaltigem Serum sowie mit wäßrigen Testlösungen überprüft. Die Versuche erstreckten sich über einen zehntägigen Zeitraum. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen; sie wurden durch Vergleich mit Merck'schen Testlösungen

korrigiert. Der Verdampfungsblock wurde täglich gereinigt, da zu große Rückstände zu niedrigeren Werten führten. Die Einbrennzeit des Gerätes wurde besonders beachtet. Bei 24 Bestimmungen eines Serums mit 2,03⁰/oo Aethanolgehalt betrug die dreifache mittlere Streuung $3s = \pm 0,10^0/\text{oo}$ entsprechend $\pm 5\%$, bezogen auf den Aethanolgehalt des Serums.

22 Bestimmungen eines Serums mit 0,75⁰/oo Aethanol ergaben eine Streuung von $3s = \pm 0,053^0/\text{oo}$. Bezogen auf den Aethanolgehalt des Serums entspricht dies $\pm 7,1\%$.

Etwas geringer war die Streuung bei 26 Bestimmungen einer wäßrigen Lösung gleicher Konzentration. Die dreifache Standardabweichung betrug hier $\pm 0,046^0/\text{oo}$, entsprechend $\pm 6,3\%$. Demnach war die Genauigkeit der Bestimmungen in wäßriger Lösung etwas besser als im Serum, was schon bei der Aufstellung der Eichkurven beobachtet werden konnte.

Für die forensische Beurteilung der Blutalkoholbestimmungen kommt nach den neuesten Richtlinien nur die Streuung in Promillewerten unabhängig vom Alkoholgehalt in Betracht. Die mittlere quadratische Abweichung (einfaches Sigma) soll dabei 0,05⁰/oo nicht übersteigen. Sollen die Aussagen eine an Sicherheit grenzende Wahrscheinlichkeit aufweisen, dann ist mit der dreifachen Standardabweichung ($3s$) zu rechnen, deren Grenze dann 0,15⁰/oo betragen soll. Unter diesem Gesichtspunkt ist die bei den vorliegenden gaschromatographischen Bestimmungen erzielte Genauigkeit als gut und völlig ausreichend anzusehen. Sie könnte durch Auswertung der Zacken mit einem elektrischen Integrator noch weiter verbessert werden.

V.F,8) Nachweisgrenze für Aethanol.

Wichtig war die Feststellung der Nachweisempfindlichkeit für Aethanol. Zu diesem Zwecke wurde eine 0,08 ‰-ige Lösung hergestellt und eine Probe von 50 μl injiziert. Die Zackenhöhe

betrag 0,8 cm. Da zur sicheren Abgrenzung von Störschwankungen der Nulllinie (sog. noise) eine Mindestzackenhöhe von 0,4 cm erforderlich ist, lag die Nachweisgrenze für Aethanol unter den obigen Bedingungen bei 0.04 %.

V.F,9) Bestimmung von Methanol und Aceton neben Aethanol.

Ein Vorteil des vorgeschlagenen gaschromatographischen Routineverfahrens liegt darin, daß mit einer Analyse gleichzeitig auch andere flüchtige Stoffe, z.B. Aceton und Methanol, bestimmt werden können. Für diese Stoffe wurden deshalb ebenfalls Eichkurven erstellt (Graphik 11).

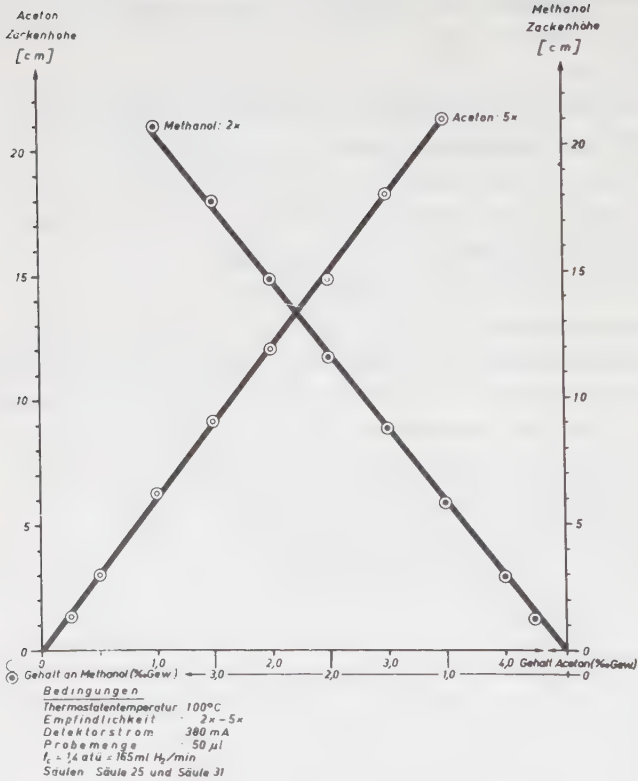
Methanol kann allerdings nur dann bestimmt werden, wenn nicht gleichzeitig zu große Aethanolumengen vorliegen. In unklaren Fällen, wenn Methanol und Aethanol in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden sind, muß auf die Säule 21 (Länge: 2 m) oder Säule 24, (Länge: 3 m) zurückgegriffen werden. Dabei ist allerdings zu beachten, daß auf diesen Säulen Aceton und Methanol nicht zu trennen sind. Liegen alle 3 Substanzen in ungleichen Mengenverhältnissen vor, so muß die Säule 7 (Länge: 3 m) herangezogen werden, da diese Säule Methanol und Aethanol auch bei größeren Konzentrationsunterschieden trennt und Aceton hier nur eine sehr kurze Retentionszeit hat. Die ermittelten Retentionswerte für Aceton und Methanol sollten in jedem Fall an einer apolaren Säule, am besten nach Ausschüttlung mit n-Amylacetat, auf der Silikonöl-Kolonnen (Fa. Beckman) verifiziert, und das Ergebnis durch mikrochemische Reaktionen abgesichert werden (s. Abschn. VI.).

V.F,10) Der Einfluß der Detektorstromstärke und der Geschwindigkeit des Gasflusses auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Um den Einfluß der genauen Einstellung der i_c und der Detektorstromstärke auf die Reproduzierbarkeit des Verfahrens zu er-

GRAPHIK 11

Eichkurven für Methanol und Aceton



mitteln, wurde für die in der Nähe des Detektorstromes von 380 mA liegenden Werte die Abhängigkeit der Zackenhöhe von der Stromstärke an einer ca. 1,5‰-igen Aethanollösung untersucht. Auf die gleiche Weise wurde die Abhängigkeit der Zacken von der f_c -Einstellung geprüft.

Wie Graphik 12 zeigt, hat eine ungenaue Einstellung des De-

tektorstromes einen besonders großen Einfluß auf die Reproduzierbarkeit des Verfahrens. Schwankungen von 10 mA bei der Einstellung im Bereich von 375 - 385 mA bewirkten eine Änderung der Zacken von 14,6 - 15,9 cm, d.h. um 8 - 9%. Eine Ungenauigkeit von 1 mA bedingt demnach schon einen Fehler von rund 1%.

Eine ungenaue Einstellung der f_c dagegen hat einen wesentlich geringeren Einfluß. Schwankungen innerhalb des großen Bereiches von $f_c = 1,35 - 1,45$ atü änderten die Zackenhöhe nur von 15,15 cm auf 14,9 cm, oder um rund 1 - 2 %. Ein Fehler der Einstellung von 0,01 atü bewirkt deshalb in diesem Bereich nur eine Abweichung von ca. 0,2 %. Deshalb entstehen bei sorgfältiger Einstellung des Arbeitsdruckes von $f_c = 1,4$ atü nach dem Rückspülen mit 2 atü keine ins Gewicht fallenden Fehler.

V.F,11) Die serienweise Anordnung von Vorkolonnen.

Bei den Analysen erwies sich das Umstellen des Hahnes als störend, weil dadurch Ausschläge und Verschiebungen der Null-Linie hervorgerufen wurden, so daß diese kurz vor Erscheinen der Aethanolzacke stets nachreguliert werden mußte. Die Veränderung der Null-Linie wurde durch die Variation des Strömungswiderstandes beim Umschalten (der f_c sinkt kurzzeitig auf Null ab, dies ergibt den Ausschlag), sowie durch den Unterschied im Strömungswiderstand beim Abschalten der Vorsäule hervorgerufen (dies bewirkt die Anhebung der Null-Linie).

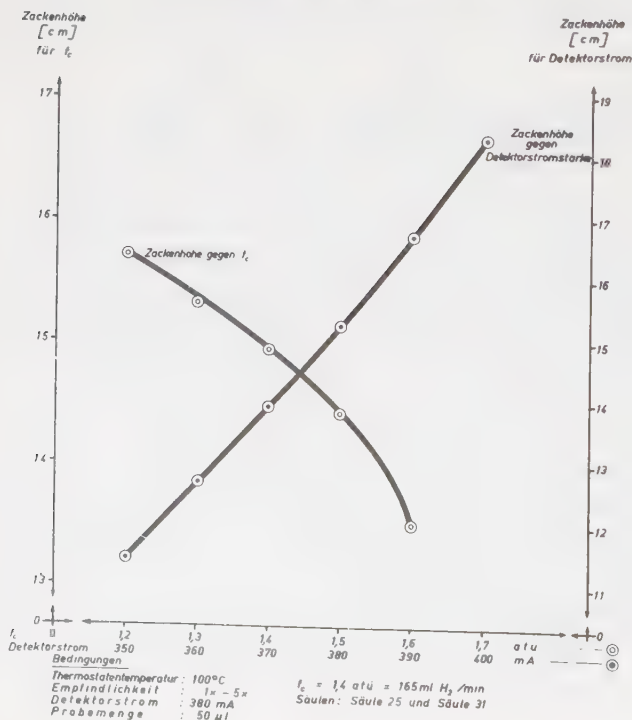
Diese Erscheinungen können durch möglichst rasches Umschalten und durch eine serienmäßige Anordnung von Vorsäulen völlig beseitigt werden. Wird dann schnell von einer Vorsäule auf eine andere umgeschaltet, entfällt die Änderung des Strömungswiderstandes fast vollständig. Außerdem kann durch eine Serie von Vorsäulen (Graphik 13) die Analysenzeit beträchtlich verkürzt werden. Dies erreicht man z.B. durch abwechseln-

des Arbeiten mit den Vorsäulenbündeln I u. II. Sind die 5 Vorsäulen eines Bündels erschöpft, so werden sie aus dem Durchfluß mit Hilfe der Haupthähne H_I u. H_{II} bzw. H_{III} u. H_{IV} ausgeschaltet und das Wasser aus ihnen mit Hilfe einer zweiten Tränergasbombe zurückgespült. Statt Trärgas könnte zum Rückspülen auch billiger Luft verwendet werden.

Bei Verwendung von nur 2 Vorsäulenbündeln könnte alle 6 Minuten eine neue Probenaufgabe erfolgen, da nach Erschöpfung

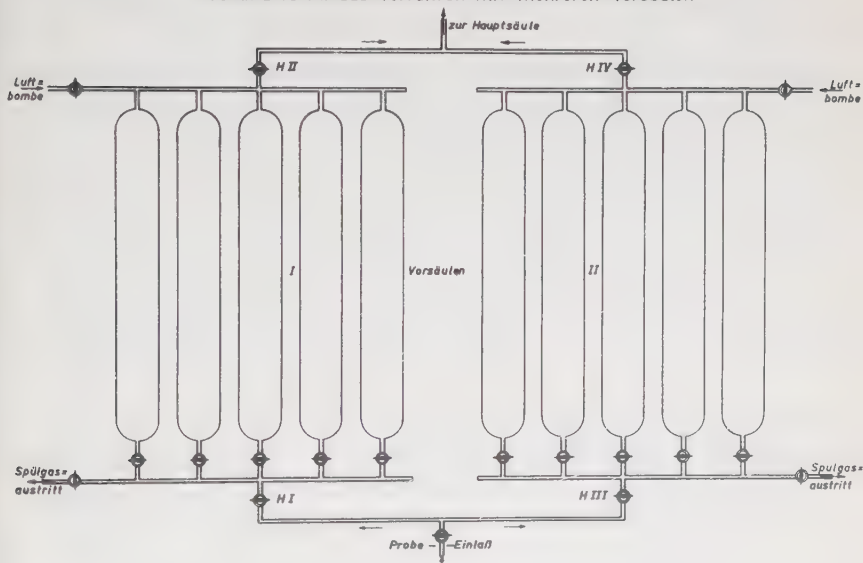
GRAPHIK 12

Einfluß von Detektorstromstärke und Geschwindigkeit des Gasflusses auf die Zackenhöhe im Blutalkohol-Routineverfahren



GRAPHIK 13

Schaltbild für das Verfahren mit mehreren Vorsäulen



eines Bündels, also nach 5 Bestimmungen, nach Übergang auf das zweite Bündel 5 mal 6 Minuten = 30 Minuten für die Rückspülung des benutzten Bündels zur Verfügung ständen. Dadurch wären 5 Doppelbestimmungen in der Stunde möglich, so daß in einem 8-Stundentag unter Berücksichtigung der Zeit für die Vorbereitungen und die quantitative Auswertung 25 - 30 Blutalkohol-

Bestimmungen durchgeführt werden könnten.

Eine weitere Verbesserung des Routineverfahrens wäre durch Verwendung eines empfindlichen Detektors (FID) möglich. Die Probemenge könnte in diesem Falle auf ca. 5 μ l gesenkt werden. Infolge der Verringerung der Wassermenge auf 1/10 könnten die Säule 31a und die Kolonne Nr. 70025 (Fa. Beckman) benutzt werden. (Abschn. V.E). Das Verfahren wäre dadurch eindeutig spezifisch für Aethanol. Im Hinblick auf die kleineren Wassermengen könnte die Rückspülzeit verkürzt und die Analysenzeit noch einmal gesenkt werden. Dazu trüge auch die verkürzte Retentionszeit von 3 Minuten für Aethanol bei. Außerdem würde Trägergas zur Rückspülung eingespart. Es wäre auch unerheblich, wenn kleinere Mengen Wasser in die Hauptkolonne gerieten, da z.B. der Flammenionisationsdetektor auf Wasser nicht anspricht. Nur größere Mengen in der für Wasser ungeeigneten Kolonne Nr. 70025 müßten das Trennvermögen vermindern.

Nachteilig wäre die größere Streuung bei der Abmessung kleinerer Probemengen. Hinzu kämen Fehler bei der exakten Einstellung des Brenngases und der Luft für den FID, der auch gegen Störungen anfälliger wäre als der Wärmeleitfähigkeitsdetektor.

Da der Thermostatenraum des GC 2-Gerätes für die Aufnahme von mehreren Vorsäulen und Hähnen viel zu klein war und es nicht gelang, einen zusätzlichen Thermostaten sowie entsprechende gasdichte Hähne zu beschaffen, mußte auf die Erstellung einer Apparatur für die routinemäßige Blutanalyse zunächst verzichtet werden. Die geplanten Arbeiten mit dem FID konnten wegen Lieferschwierigkeiten seitens der Fa. Beckman ebenfalls nicht zur Durchführung kommen.

V.F,12) Diskussion der Ergebnisse.

An ein Routineverfahren sind die folgenden wichtigsten Anforderungen zu stellen:

- 1.) Spezifität, 2.) Einfachheit in der Ausführung,
- 3.) Schnelligkeit, 4.) gute Reproduzierbarkeit,
- 5.) möglichst geringe Kosten, 6.) geringe Störanfälligkeit.

Auf diese Punkte soll eingegangen werden und das vorgeschlagene Routineverfahren, namentlich im Vergleich zu den Arbeitsweisen der Widmark-, ADH- und Vidic-Verfahren, diskutiert werden.

- 1.) Eine weitgehende Spezifität ergab sich bei der Überprüfung mit 38 flüchtigen Substanzen für das Verfahren mit den in Abschn. V.E beschriebenen Kolonnen, während bei der Methode mit der Vorsäule 31 und der Säule 25 (s.Abschn.V.F) ein iso-Butanolgehalt stören würde. Iso-Butanol ist allerdings eine Substanz ohne größere toxikologische Bedeutung, sie kann auf Säule 32 außerdem völlig ausreichend von Aethanol unterschieden werden. Besonders gut ist die Abtrennung des Aethanols von apolaren flüchtigen Substanzen (z.B. Benzin) sowie von Aceton und Narkosemitteln.
- 2.) Das Verfahren ist relativ einfach in der Ausführung. Aus den zentrifugierten Blutproben werden 1 - 2 ml Serum entnommen, diesem mit einem Meßlöffel die entsprechende Menge Bleinitrat zugesetzt, 1 Min. geschüttelt und zentrifugiert. Das klare Zentrifugat wird mittels Mikrospritze in die Verdampfungskammer injiziert. Die Bedienung der gaschromatographischen Apparatur ist einfach, muß allerdings exakt nach der Stoppuhr erfolgen. Die Höhen der automatisch registrierten Zacken werden gemessen und aus der Eichkurve die Alkoholkonzentration abgelesen. Zur Erhöhung der Genauigkeit ist ein elektrischer Integrator zu empfehlen.
- 3.) In Bezug auf die Analysendauer wäre das Verfahren den bisher üblichen Methoden etwa gleichwertig. Beim Arbeiten mit zwei Bündeln von je 5 Vorkolonnen wären in der Stunde 5 Doppelbestimmungen und bei Berücksichtigung der Wartung

des Gerätes und von Nebenarbeiten 25 Doppelbestimmungen in 8 Arbeitsstunden durchführbar.

- 4.) Die Genauigkeit des Verfahrens entspricht durchaus den strengen Anforderungen im Sinne der neuen Richtlinien. Die dreifachen mittleren Abweichungen lagen bei den bisherigen Bestimmungen z.T. noch erheblich unter dem Grenzwert von 0,15 %.
- 5.) Die Neuanschaffung des Gaschromatographen samt den benötigten Zusätzen ist verhältnismäßig kostspielig. Dagegen sind die Kosten für den laufenden Betrieb niedrig und durch die Abnutzung des Gerätes und den Verbrauch des Trägergases bedingt. Beim Verfahren mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor käme der relativ hohe Preis für gereinigte synthetische Luft hinzu, während die Kosten für den Wasserstoff des Brenners kaum ins Gewicht fallen. Recht teuer sind auch die Teflonkölbchen für die Mikrospritze, die allerdings in einer geeigneten Werkstatt erheblich billiger selbst hergestellt werden könnten. Die laufenden Kosten wären beträchtlich niedriger als für das ADH-Verfahren, dem außerdem eine geringere Spezifität zukommt.
- 6.) Das vorgeschlagene Verfahren bedarf einer komplizierten technischen Apparatur, die wie jedes technische Gerät störanfällig ist.

Um die Fehlermöglichkeiten auf ein Mindestmaß zu begrenzen, sind auf Grund der gesammelten Erfahrungen folgende Hinweise genau zu beachten:

Exakte Einstellung des Abstandszyinders an der Mikrospritze.
Sorgfältiges Spülen der Spritze mit der zu analysierenden Lösung.

Prüfung der Gummiabdichtung des Probееinlasses auf Undichtigkeiten.

Konstanz der Temperatur des Verdampfungsblockes.

Regelmäßige Reinigung des Verdampfungsblockes.

Vermeidung von Kondensation in den Zuleitungen zum Gaschromatographen.

Vermeidung von Verdampfungsverlusten der stationären flüssigen Phase und einer Rückstandsbildung in der Kolonne.

Zeitlich exaktes Umstellen des Hahnes.

Regelmäßige Überprüfung des Detektors. Beim FID ist ferner auf genaue Einstellung des H_2 für den Brenner und auf die Einstellung der Luft zu achten.

Genügende Einbrennzeit des Gerätes.

Genaue Einstellung der Geschwindigkeit des Gasflusses (s. Abschn. V.F, 10).

Vermeidung von Schwankungen des Detektorstromes und der Thermostatentemperatur. (s. Abschn. V.F, 10).

Sorgfältige Rückspülung der Wassers.

Häufige Nacheichungen mit Merck'schen Testlösungen.

Vermeidung von Ablesefehlern bei der quantitativen Auswertung der Zacken (Werte doppelt mit stets gleichem Meßgerät dem Chromatogramm entnehmen) und beim Ablesen an der Eichkurve. Diese Fehler entfallen bei der Verwendung eines Integrators.

Abschließend seien die Vor- und Nachteile des Verfahrens kurz zusammengefaßt:

Vorteile: Gleichzeitige qualitative und quantitative Bestimmung mehrerer flüchtiger Substanzen in Blut und Körperflüssigkeiten. - Hohe Genauigkeit und Spezifität der Bestimmungen. - Einfachheit in der Ausführung der Analysen und Wegfall von Wäge- und Pipettenfehlern. - Relativ geringe laufende Kosten. - Automatische Registrierung mit gleichzeitiger Dokumentation der Ergebnisse.

Nachteile: Der Gang der Analyse muß mit der Stoppuhr geregelt

werden; - Reinigung des Verdampfungsblocks erforderlich (möglichst 2 x täglich). - Ständige Kontrolle und Überwachung der Apparatur wegen ihrer Störanfälligkeit.

VI.) Gaschromatographischer Trennungsgang zur Identifizierung flüchtiger Giftstoffe in Blut und Körperflüssigkeiten.

Über in Blut und Geweben vorkommende flüchtige Substanzen von forensischem Interesse sind schon recht zahlreiche gaschromatographische Arbeiten veröffentlicht worden. Wegen der Fülle der Literaturangaben kann auf Einzelheiten nicht weiter eingegangen werden. Die folgenden Literaturzitate befassen sich nur mit den für die vorliegende Arbeit wichtigsten Ergebnissen.

Toxikologisch wichtige organische Schwefelverbindungen wurden an Säulen mit verschiedenen Phasen, wie Trikresylphosphat, Paraffinöl u.a. getrennt (AWBOR (88), KARCHMER (89), PILLERI u. MICHELIA (103), ROMOVACEK u. NOVOTNY (104)). Über die Trennung von halogenierten Kohlenwasserstoffen berichteten PURNELL u. SPENCER (90), TODD (91), POLLART u. HARDY (92)). Die Untersuchungen zur gaschromatographischen Trennung von Aldehyden, Ketonen, Narkosemitteln und einigen anderen polaren Substanzen sind besonders umfangreich: FOX (4), SMITH (5), BROWNING u. WATTS (7), BODMER u. MAYEUX (8), JANITZKI (43), MATUWARA u. KINOSHITA (62), SALO (70), TODD (91), SINGLIAR (93), KUBINOWA (94), COLLINS (95), SCHOLZ (96), BUTLER (97), MARIQ u. MOLLE (98), KOROL (99), SINGLIAR et al. (100), PORCARO (101), SCHWENKER (102), EGLINTON (110), FUKUDA u. OMORI (111), JANAK u. HVRINAG (113), LAPIERE u. VERSIE (114), ROLLS (115), SVERKA u. REISER (116), HOFFMANN (118) sowie KEULEMANS et al. (119).

Trennungen von Benzol und substituierten, aromatischen Verbindungen beschrieben PILLERI u. MICHELIA (103), FELDSTEIN (108), u. DURREL (109), Pyridine wurden von BECORA u. DINEEN (105) aufgetrennt, über die gaschromatographische Analyse des Paraldehyds berichteten MACHATA (106) sowie BOMBAUGH u. BULL (107). Phenole wurden von HVRINAG (112) und JANAK (117) bearbeitet.

Über spezielle Anwendungen der Gaschromatographie auf toxikologische Probleme berichteten verschiedene Autoren. JANITZKI (43) führte Versuche über den gaschromatographischen Nachweis flüchtiger Substanzen im Blut nach Aufnahme durch die Atemwege durch. Sie verwendete, wie beim Ausschüttelungsverfahren (DIETZE (15)), Propylacetat und analysierte verschiedene Alkohole, Acetate, Aether, Aceton und Benzol an einer Säule aus Polyglykol-Dinonylphthalat. MACHATA (120) berichtete über zwei Vergiftungen mit Paraldehyd und Terpentinöl. Die beiden Substanzen wurden nach Wasserdampfdestillation mit Aether extrahiert und an einer Siliconölkolonne aufgetrennt. Dadurch konnte auch die Identität und die Herkunft der beiden Substanzen geklärt werden, da sowohl Reinsubstanz und Extrakt aus Organen identische Bandenfolgen ergaben.

JOHNS u. CADMAN (121) wandten die Gaschromatographie ebenfalls auf spezielle toxikologische Probleme an. Sie untersuchten Suicidfälle mit Cyclopropan und Pentinol, analysierten Benzine und konnten die Charge eines Flugbenzins bei einer Brandstiftung identifizieren. Auch CHUNDELA u. JANAK (122) beschrieben Vor- und Nachteile der gaschromatographischen Analyse bei Vergiftungen. Sie untersuchten Intoxikationen mit organischen Halogenverbindungen, sowie Methanol und bestimmten auch den Blutalkohol auf diesem Wege.

Bisher fehlte es jedoch an einer systematischen Arbeit, die eine Reihe toxikologisch wichtiger Substanzen in einem Trennungsgang zusammenfaßt, der ihre Auftrennung, Identifizierung und quantitative Analyse erlaubt.

Ein solches System zu finden ist für die forensisch-toxikologische Praxis notwendig, weil die gaschromatographische Identifizierung von Substanzen mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden ist. Während man in der Papier- und Dünnschichtchromatographie den Nachweis einer unbekannten Substanz durch die Kombination von Rf-Werten mit verschiedenen

Farbreaktionen, sowie mikrochemischen Methoden absichern kann, ist diese Methode für die Gaschromatographie nicht ohne weiteres möglich. Eine zusätzliche Identifizierung ist häufig nur durch sehr mühevollen und aufwendigen Analysenmethoden auf physikalisch-chemischer Grundlage möglich, die einen erheblichen technischen Aufwand erfordern. Die sich daraus ergebende Unsicherheit bei gaschromatographischen Analysen kann nur vermindert werden, wenn man die fragliche Substanz auf verschiedenen Säulen entwickelt und die erhaltenen Retentionszeiten mit bekannten Werten vergleicht.

Ein solches Verfahren, das zur besseren Absicherung des Ergebnisses einer gaschromatographischen Analyse dient, ist bereits von BROWN (123) vorgeschlagen worden. Er identifizierte unbekannte Substanzen durch den Vergleich der Retentionszeiten an drei verschiedenen Säulen: An einer Säule mit apolarer Phase, an einer Füllung mit einem Elektronenpaar-Akzeptor und an einer Säule mit einer flüssigen Phase, die als Elektronenpaar-Donator diente.

Auch KARCHMER (89) trennte und identifizierte 14 schwefelhaltige organische Verbindungen an Säulen mit Füllungen unterschiedlichen elektrophilen Charakters. Er benutzte als apolare Säule Paraffinöl auf Celite und als stark polare Phase Iminodipropionitril.

LEWIS et al. (124) verglichen ein solches Verfahren mit einer zweidimensionalen Papierchromatographie. Sie trugen die an zwei Säulen stark divergierender Polarität gewonnenen Logarithmen der Retentionsvolumina gegeneinander auf und erhielten für homologe Reihen Geraden.

ROHRSCHEIDER (125) sowie MAIER u. KARPATY (126) machten exakte Angaben über Polaritätswerte flüssiger stationärer Phasen. Sie erwähnten auch, daß die Trennkraft einer gemischten flüssigen Phase keine lineare Funktion der Trennkräfte der Komponenten ist, eine Beobachtung, die im Laufe der eige-

nen Versuche immer wieder bestätigt werden konnte. Die stärkste polare Phase mit dem Polaritätswert 100 war Oxydipropionitril, die niedrigste Polarität hatte Squalan mit dem Wert 0. Geringe Polaritäten hatten auch Siliconöl mit dem Wert 7 und Paraffinöl mit dem Wert 11. Die Polarität von Polyglykol betrug bereits $\frac{3}{4}$ der des Oxydipropionitrils, noch stärker polar war Diglycerin, während Ucon (Wert 42) ziemlich auf der Mitte zwischen Polarität und Apolarität lag.

Das Ziel der folgenden Untersuchung war es, die Identifizierung einer Anzahl wichtiger Substanzen durch Vergleich der Retentionswerte an verschiedenen Säulen zu verbessern. Die in Tabelle 14 in der Reihenfolge ihrer Siedepunkte zusammengestellten 38 Substanzen sollten so der systematischen gaschromatographischen Analyse zugeführt werden.

Da eine Auftrennung an 3 verschiedenen Säulen sehr lange dauern würde, auch in der Papierchromatographie meist nur zwei Laufgemische Verwendung finden, und da ferner nur ein Zweikolonnenventil (Fa. Beckman) zur Verfügung stand, sollte versucht werden, die ausgewählten Substanzen an 2 verschiedenen Säulen aufzutrennen, deren Polarität stark differieren sollte

Weitere Anforderungen an den Trennungsgang waren:

- 1.) Schnelligkeit. (Analysenzeit möglichst unter 15 Min.).
Ferner sollte auch eine Säule gefunden werden, die in der Lage war, in noch kürzerer Zeit eine Aussage über die Abwesenheit flüchtiger Substanzen zu machen.
- 2.) Eignung zur Analyse von wässrigen Proben. Ein aufwendiger und zu Fehlern führender Ausschüttelungsgang war zu vermeiden.
- 3.) Einfachheit in der Ausführung.
- 4.) Ausreichende Sicherung der Identität, d.h. weitgehende Spezifität des Verfahrens.

Tabelle 14

Substanz

Retentionszeit auf

Siedepunkt (°C)	Kolonne Nr. 70025	Säule 2 (Polyglykol Länge: 2,5 m)	Säule 7 (Diglycerin Länge: 3 m)	Säule 7 (Diglycerin Länge: 2 m)	Säule 32	Säule 28d	Siliconöl- kolonne (Fa. Beckman)
Formaldehyd	-21°	1'38"	6'54"	8'45"	5'23"	2'57"	-
Aethylchlorid	12,2°	57"	-	-	47"	1'14"	-
Acetaldehyd	20,2°	9'16"	18'48"	2'23"	7'4"	10'57"	9'28"
Aether	24,6°	1'2"	1'24"	43"	41"	1'41"	1'27"
Petrolaether	40°-70°	55"; 1'08" 1'19"	51"; 1'7" 1'34"	36"	27" 40"	1'48"; 2'2" 2'37"; 3'18"	1'20"; 1'42" 2'1"
Dichlormethan	41,6°	2'15"	6'43"	1'15"	2'28"	1'58"	1'48"
Schwefelkohlenstoff	46,2°	1'43"	2'51"	-	1'3"	3'28"	1'58"
Aceton	56,3°	1'35"	4'12"	2'11"	2'22"	1'50"	1'32"
1,2-Dichloräthan	58°	5'27"	16'17"	2'16"	5'55"	4'45"	4'5"
Benzin	60°-80°	57"; 1'24" 1'35"; 2'11" 2'48"	1'12" 1'56" 2'31"	37"	29" 44" 55"	2'34"; 3'17" 3'58"; 5'14" 6'57"	1'23" 2'1"; 3'13" 2'23"; 4'3"
Chloroform	61,2°	4'34"	-	1'31"	4'5"	3'39"	3'8"
Methanol	64,7°	1'22"	6'30"	8'43"	5'14"	2'37"	47"
n-Heptan	68,7°	3'2"	-	-	41"	8'32"	4'26"
Aethyljodid	72,8°	3'11"	-	-	2'11"	4'34"	-
Tetrachlorkohlen- stoff	76,7°	3'31"	-	54"	1'55"	6'24"	4'15"
Aethylacetat	77,1°	2'43"	5'52"	1'32"	2'35"	2'55"	3'2"
Aethanol	78,5°	1'59"	8'12"	7'47"	6'	2'43"	1'11"
Methyläthylketon	79,2°	3'6"	6'53"	2'23"	3'25"	3'5"	2'54"
Benzol	80,12°	4'10"	8'24"	1'14"	3'4"	6'	4'24"
Cyclohexan	80,8°	2'42"	2'24"	40"	56"	7'15"	4'1"
tert.-Isobutanol	83°	2'38"	-	-	4'19"	2'32"	-
Trichloräthylen	87,2°	5'44"	10'28"	1'14"	3'30"	8'9"	5'17"
Isopropanol	88,5°	2'24"	7'42"	5'27"	5'16"	2'31"	1'30"

Fort. Tabelle 14

		größer als 40'	größer als 40'	größer als 30'		
Chloralhydrat	96°	-	15'5"	30'	4'45"	6'20"
n-Propanol	97,2°	4'5"	15'5"	5'33"	9'48"	2'12"
sek-Butanol	100°	4'51"	-	3'53"	8'21"	2'41"
Naphthalenzin	100°- 140°	-	-	28"	42" 58"	-
Propylacetat	101,6°	5'10"	10'2"	1'47"	4'1"	5'57"
iso-Butanol	108°	6'32"	-	-	11'36"	2'39"
Toluol	110,8°	8'39"	15'	1'28"	5'1"	8'48"
Pyridin	115,5°	11'12"	40-45'	20'47"	27'16"	8'57"
n-Butanol	117°	9'	-	-	16'57"	3'1"
iso-Butylacetat	118°	10'53"	16'49"	2'11"	1'19"	11'30"
Paraldehyd	124°	9'16"	18'48"	2'21"	7'4"	9'28"
iso-Amylöl	130°	15'	-	-	7'35"	3'41"
Monochlorbenzol	132°	18'4"	41'	2'58"	13'12"	15'14"
Xylol	140°	17'42"	26'40"	1'48"	8'4"	16'9"
iso-Amylacetat	142°	15'	45'-48'	3'9"	8'25"	17'46"
Wasser t. _R	100°	1'25" 2'15"	16'20" 19'30"	größer als 45'	17'45" 21'40"	35" 1'25"

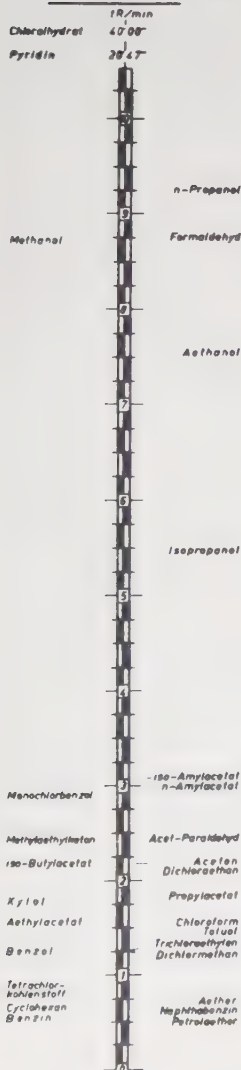
(bei 50 µl Probe)

Arbeitsbedingungen auf Säule					
Kolonne Nr.	Säule 7 (Länge 3m)	Säule 7 (Länge 2 m)	Säule 32	Säule 28d	Siliconölkolonne (Fa. Beckman)
Thermostattemp.	100° C	100° C	100° C	100° C	100° C
fc	1,45 atü =180 ml/min.	1,5 atü =177 ml/min.	1,5 atü =165 ml/min.	1,5 atü =185 ml/min.	1,4 atü =165 ml/min.
Detektorstrom	300 mA	275 mA	300 mA	300 mA	300 mA
Probe	jeweils 5 µl (bei Wasser 50 µl) der Reinsubstanzen				

GRAPHIK 14

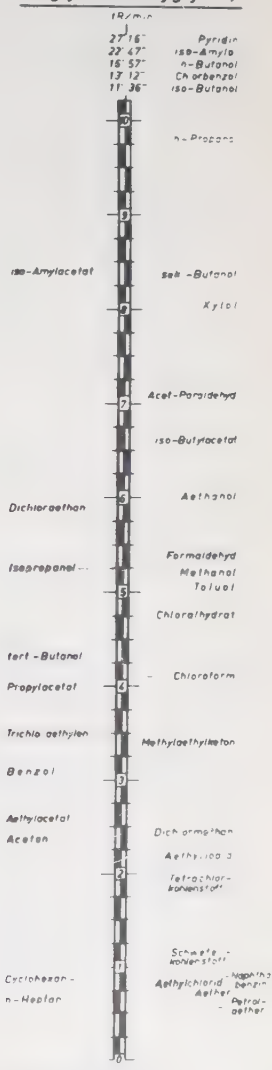
Graphische Darstellung der Retentionszeiten auf

Säule 7
(Diglycerin)



GRAPHIK 15

Säule 32
(Diglycerin/Polyglykol)

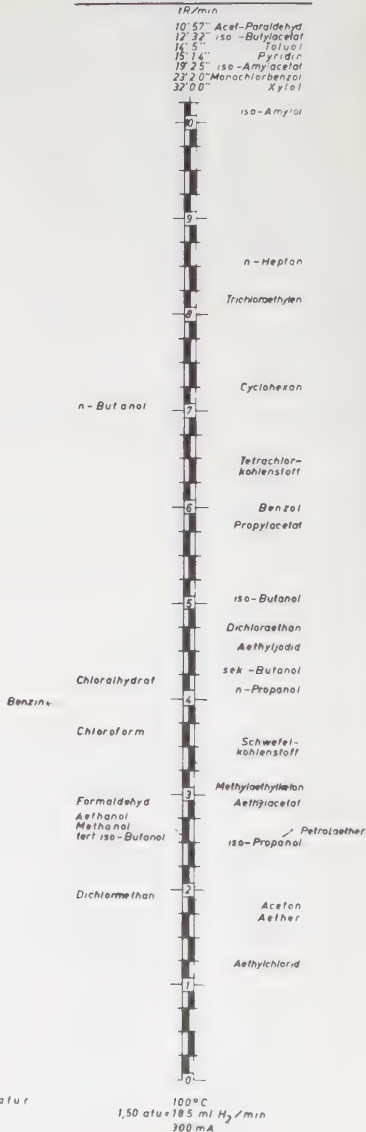
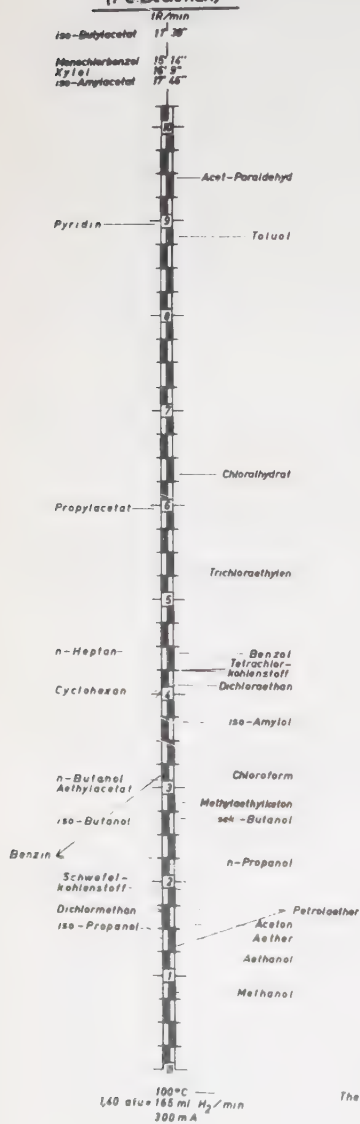


GRAPHIK 16

Graphische Darstellung der Retentionszeiten
auf Silikonölkolonne (Fa Beckman)

GRAPHIK 17

Säule 28d
(Paraffinöl/Diglycerin)



Bedingungen

Thermostattemperatur

t_c

Detektorstrom

Bei den in Tabelle 14 aufgeführten und zu trennenden Stoffen handelte es sich um Substanzen mit z.T. äußerst unterschiedlicher Polarität. Es schien von vornherein ausgeschlossen, ein Gemisch aller dieser heterogenen Substanzen an nur einer Säule aufzutrennen. Es sollte jedoch der Versuch gemacht werden, Kolonnen zu ermitteln, bei denen die Substanzen in einem möglichst gut verteilten "Spektrum" aufgetrennt waren, d.h. ohne Häufung von Substanzen bei bestimmten Retentionszeiten.

VI. 1) Versuche zur Auffindung einer polaren Trennkolonne.

Dazu wurde auf einige bereits angewandte Säulen zurückgegriffen. Als erste Säule wurde die durch ihr gutes Trennvermögen ausgezeichnete Kolonne Nr. 70025 (Fa. Beckman) für die angegebenen Substanzen erprobt, obwohl ihre flüssige Phase nur von mäßiger Polarität war. Sollte diese Kolonne, deren Wasserrückhaltevermögen unzureichend war, für das Verfahren adaptiert werden, so war ein Zusatz von Diglyzerin notwendig. Durch die Zugabe dieser stark polaren Substanz wäre die Polarität der Säule beträchtlich angestiegen. Mit diesen Versuchen war gleichzeitig eine erneute Überprüfung der Spezifität des Ausschüttelungs- (s. Abschn. III.A) sowie des Routineverfahrens mit der Kolonne Nr. 70025 verbunden (s. Abschn. V.E).

Die Säule zeigte eine ausgezeichnete Spezifität für die niedrigen aliphatischen Alkohole (Chromatogr. 1). Die Retention von Wasser war völlig unzureichend. Eine wäßrige Probe von 50 µl wurde kurz nach der Totzeit der Säule (t_0) noch vor den leicht flüchtigen Substanzen, wie Petroläther und Benzin eluiert.

Die Retentionszeit für Wasser lag bei 1'27" und es war ein scharfer Abfall der Wasserzacke zu verzeichnen. Die apolaren flüchtigen Substanzen (s. Tabelle 14) wie Petroläther, Äther und Äthylchlorid, wurden ebenfalls kaum zurückgehalten, ebensowenig auch der stark polare Methanol, der auf dieser

Säule noch vor Aceton erschien. Das relativ niedrig siedende Dichlormethan wurde erst nach dem Aethanol eluiert, ein weiterer Hinweis dafür, daß der Charakter der Säule nur als schwach polar bezeichnet werden kann. Iso-Propanol wurde vor tert.-Butanol, Cyclohexan u. Aethylacetat eluiert, ebenso auch Methyläthylketon und n-Heptan vor den viel niedriger siedenden Substanzen Aethyljodid und Tetrachlorkohlenstoff. Etwa entsprechend ihren Siedepunkten erschienen dagegen iso-Butanol, Toluol, n-Butanol, Paraldehyd, Butylacetat und Pyridin. Sehr lange t_R hatten nur vier relativ hoch siedende Substanzen: Iso-Amylol, Amylacetat, Xylol, Chlorbenzol. Für Formaldehyd und Chloralhydrat ergaben sich Retentionswerte von über 30 Min., so daß die Kolonne Nr. 70025 für die Analyse dieser Substanzen ungeeignet war. Die größten Nachteile dieser Säule bestanden in der geringen Selektivität gegen Wasser und ihrer schwachen Polarität. Ihr Vorteil war ein befriedigendes Spektrum der Substanzen über einen relativ kurzen Analysenbereich von ca. 13 Min. Die Zackenformen waren ausgezeichnet und die Trennungen der Substanzen in organ. Solventien auch bei kleinen Differenzen der Retentionswerte ausreichend.

Um das geringe Rückhaltevermögen der Säule für Wasser zu verbessern, wurde die Kolonne 31 davorgeschaltet. (Arbeitsbedingungen: Therm.-Temp.: 100°C , fc: 1,55 atü; Detektorstrom: 280 mA). Die t_R des Wassers lag bei 25'30"; das Rückhaltevermögen war bei der Kombination der beiden Säulen, wie auch schon in Abschn. V.A,4 erwähnt, als überraschend groß zu bezeichnen. Die Trennungen waren hingegen deutlich verschlechtert und die Zacken nicht mehr so scharf und gleichmäßig wie vorher. Methanol, Aethanol, iso-Propanol konnten nicht mehr getrennt werden, sek.-Butanol und n-Propanol kamen ebenfalls als gemeinsame Zacke. Bei diesen polaren Substanzen machte sich der Einfluß des Diglyzerins besonders stark bemerkbar. Bei den apolaren Substanzen hatte sich dagegen in der Reihenfolge wenig geändert, es traten nur unbedeutende t_R - Verlän-

gerungen auf. Die Anzahl der Stoffe mit großen Retentionswerten war um Pyridin vermehrt, auch n-Butanol wurde sehr spät eluiert. Insgesamt ließen jedoch die mangelhaften Formen der Zacken mit starker Schwanzbildung, die nur mäßige Polarität und die Häufung von Substanzen bei bestimmten Retentionszeiten die Säulenkombination ungeeignet erscheinen. Durch eine gemeinsame Imprägnierung von Diglycerin und Flexol (Abschn. V.A,4) sollte die Trennung verbessert werden (Säule 16). Der Diglyceringehalt war zu klein gewählt, denn der Beginn der Wasserzacke lag schon bei 8 Min., während der Gipfel der Zacke sehr verzögert erst bei 13'30" erschien. Schon die Injektion von nur wenigen Testsubstanzen ließ erkennen, daß das Trennvermögen zwar sehr gut war, aber sehr viele Substanzen erst in oder nach der Wasserzacke eluiert wurden, z.B. n-Propanol, Toluol, Paraldehyd. Zwar hätte der Diglyceringehalt noch weiter gesteigert werden können, was zu einer Verbesserung der Polarität und des Wasserretentionsvermögens geführt hätte. Aber wie aus der Reihenfolge der Eluierung auf der Kolonne Nr. 70025 sowie den sehr kurzen Retentionszeiten der meisten Substanzen auf der Diglycerinkolonne geschlossen werden konnte, wären die Substanzen bei niedrigen Retentionswerten zusammengedrängt worden.

Bessere Ergebnisse waren von der Erprobung anderer flüssiger Phasen zu erwarten. Als nächste Substanz wurde Trikresylphosphat (Säule 30) untersucht. Die t_R des Wassers lag bereits bei 4'25". Auch auf dieser Säule wurden zunächst die leichter flüchtigen Substanzen eluiert, dann folgte trotz Differenz der Siedepunkte von 18° C Methanol gemeinsam mit Schwefelkohlenstoff. Das apolare n-Heptan trat kurz nach dem Aceton aus der Säule aus, und trotz 40° C Unterschied in den Siedepunkten wurden Cyclohexan und Dichlormethan gemeinsam entwickelt. Bis auf Chloroform und Aethylacetat wurden die Substanzen sonst ziemlich genau in der Reihenfolge der Siedepunkte aufgeteilt. Der Nachteil der flüssigen Phase lag

in den langen Retentionszeiten von 13 der untersuchten Substanzen, unter den sehr spät eluierten Stoffen waren so relativ niedrig siedende, wie Trichloraethylen, Propylacetat und Acetaldehyd. Ferner war das Wasser-Rückhaltevermögen nur gering ausgeprägt. Die mangelnde Retention des Wassers sollte durch den Zusatz von Diglycerin verbessert werden; deshalb wurde die Säule 31 davorgeschaltet. Außerdem wäre es durch Verwendung eines Zwei-Kolonnenventils wie beim Routineverfahren möglich gewesen, durch Rückspülen des Wassers eine weitere Verkürzung der Analysenzeit zu erreichen. An der Reihenfolge der eluierten Substanzen wurde durch das Vorschalten der Kolonne nicht viel geändert. Die Trennungen waren dagegen verschlechtert, und die Retentionswerte für viele Substanzen wiederum sehr groß. Länger zurückgehalten wurden erwartungsgemäß auch die polaren Alkohole. Die Retentionszeit des Wassers lag bei 25'30". Insgesamt war auch die Säule 30 und ihre Kombination mit Säule 31 für den Trennungsgang nicht geeignet.

Sodann wurde Polyglycol 1000 überprüft und auf die früher verwendete Säule 2 zurückgegriffen, Arbeitsbedingungen und Retentionszeiten sind aus Tabelle 14 ersichtlich. Zehn der Substanzen hatten, ähnlich wie auf Säule 30, Retentionswerte von über 15 Min. Nur zwei der nur sehr spät erscheinenden Substanzen erschienen außerdem vor der Wasserzacke (t_R : 19'30"), die nach der Wasserzacke eluierten Stoffe wären der Analyse auf dieser Säule nicht zugänglich gewesen. Neben den durch die langen Retentionszeiten bedingten ungünstigen Analysenzeiten wäre auch ein beträchtliches Absinken der Nachweisempfindlichkeit nachteilig gewesen, da die Zacken gesetzmäßig mit steigender Länge der Retentionszeiten breiter und flacher werden.

Die Säule trennte von wenigen Ausnahmen abgesehen etwa in der Reihenfolge der Siedepunkte. Die apolaren Substanzen erschie-

nen jedoch trotz etwas höherer Siedepunkte vor den polaren, z.B. Toluol vor n-Propanol, Chlorbenzol und Xylol vor Pyridin. Sehr rasch traten die apolaren flüchtigen Substanzen wie Petrolaether, Benzin, Aether aus der Säule, dann erschien trotz Siedepunkt bei 80° C das apolare Cyclohexan vor Schwefelkohlenstoff (Siedepunkt 42° C) und Aceton. Iso-Propanol und Aethanol wurden nicht getrennt, der iso-Propanol erschien trotz 11° C höherem Siedepunkt sogar noch kurz vor Aethanol.

Aus ähnlichen Gründen wie bei Säule 30 konnte diese Kolonne nicht verwendet werden, da die Trennungen nicht ausreichend waren und das Spektrum der Substanzen zu weit nach hinten verschoben war.

Für die Erprobung von Diglyzerin wurde auf die bereits früher verwendete Säule 7 (Länge: 3 m) zurückgegriffen (Tab.14, Graphik 14). Petrolaether und Benzin wurden von dieser polaren Säule nicht in einzelne Komponenten aufgetrennt, sondern erschienen als völlig einheitliche Zacken, deren Retentionswerte nur 2 - 3 Sek. länger waren, als die Totzeit der Säule betrug. Sie wurden also in der Säule überhaupt nicht zurückgehalten, ein Zeichen, daß eine Verteilung in der flüssigen Phase gar nicht stattfand. Sehr kurze Retentionswerte hatten auch so relativ hoch siedende Substanzen, wie Cyclohexan, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Trichloraethylen, Toluol und Xylol. Die t_R von Par- und Acetaldehyd waren wie auf anderen Säulen identisch, wahrscheinlich bildete sich bei der hohen Temperatur im Verdampfer monomeres Aldehyd. Die Retentionswerte der polaren Substanzen waren dagegen recht lang, der stärker polare Methanol wurde erst hinter iso-Propanol und Aethanol gemeinsam mit n-Propanol eluiert. Eine sehr lange Retentionszeit hatte Amylacetat. Dies war insofern günstig, als diese Substanz für eine evtl. Ausschüttelung in Betracht kommen sollte (s. Abschn. VI,3). Lediglich für Chloralhydrat war die Retentionszeit so lang, daß diese Substanz auf der Säule nicht analysiert werden konnte.

Betrachtet man die Retentionswerte der Substanzen auf Säule 2 und Säule 7 in Tabelle 14, so fällt auf, daß die beiden flüssigen Phasen in ihrem Trennvermögen ein entgegengesetztes Verhalten zeigen. Während bei der Polyglykol-Kolonnen das Spektrum nach hinten verschoben ist, zeigt die Diglyzerinkolonnen eine Anhäufung von Substanzen bei niedrigen t_R . Eine für den Trennungsgang geeignete Säule mußte sich durch Kombination beider flüssiger Phasen herstellen lassen. Da die starke Wasserretention des Diglyzerins bekannt war und das Polyglykol ebenfalls Wasser gut zurückhält, wurde das Mengenverhältnis der beiden Substanzen nicht 1:1 gewählt, sondern eine Relation von Diglyzerin zu Polyglykol in der flüssigen Phase wie 1:2 ausprobiert und auf die bereits angewendete Säule 11 zurückgegriffen. Das Spektrum war gleichmäßig auseinandergezogen, von einigen Ausnahmen abgesehen, wurden die Substanzen innerhalb von 13 Min. eluiert. Die meisten leicht flüchtigen apolaren Substanzen hatten kurze Retentionszeiten, ebenso Tetrachlorkohlenstoff, Cyclohexan u. Schwefelkohlenstoff, wie dies auch auf den Säulen 2 und 7 der Fall war. Verglichen mit Säule 2 wurden Aethylacetat, Aceton, Aethylmethylketon deutlich schneller eluiert. Benzol und Dichlormethan, die auf Säule 2 lange t_R hatten, wiesen auf der Kombinationssäule mittellange Retentionswerte auf. Relativ unverändert in ihren t_R blieben Trichloraethylen, Butylacetat, Formaldehyd, Chlorbenzol. Auffälligerweise wurden auch die polaren Substanzen, wie Methanol, iso-Propanol und Aethanol schneller entwickelt, als auf den Säulen mit reiner Füllung. Dies war ein weiterer Hinweis darauf, daß die Eigenschaften einer Kombinationssäule nicht einfach als die Addition der Eigenschaften der einzelnen flüssigen Phasen aufgefaßt werden dürfen. Diese Tatsache macht auch die Suche nach neuen Säulen schwierig, da vieles nicht gesetzmäßig, sondern nur empirisch erklärt werden kann. Chlorbenzol, Acet- u. Paraldehyd, die auf Säule 2 sehr lange Retentionszeiten hatten, wa-

ren auf dieser Säule der Analyse leicht zugänglich. Schlecht zu bestimmen waren auf der Kolonne lediglich 4 Substanzen: n-Butanol, iso-Amylol, Pyridin, Chloralhydrat.

Da bei der Säule 11 die Trennungen für manche Substanzen wegen der geringen Länge der Kolonne nicht ausreichen konnten, wurde eine längere Säule identischer Füllung hergestellt. Die Säule 32 wurde so bemessen, daß befriedigende Trennungen erzielt wurden, ohne daß die Retentionszeiten durch die Säulenverlängerung zu stark anstiegen (Tab. 14, Graphik 15). Das Wasser wurde ausgezeichnet zurückgehalten, die t_R lag bei 21'40", der Beginn der Wasserzacke bei 17'45". Wie Graphik 14 zeigt, lagen die Substanzen mit ähnlichen Retentionszeiten meist in Zweier- oder Dreiergruppen zusammen. Diese Säule wurde deshalb als polare Kolonne für den Trennungsgang gewählt.

Um die Trennfähigkeit der Säule 32 zu überprüfen, wurden Testlösungen injiziert, die in Aether und Amylacetat ca. 1 % der betreffenden Substanzen enthielten. Wie aus den Chromatogrammen 10 - 12 hervorgeht, wurden selbst so nahe beieinander liegende Substanzen, wie Aceton, Benzol und Trichloraethylen, sowie Chloroform und Trichloraethylen (t_R -Diff. ca. 25 Sek.) völlig ausreichend voneinander getrennt. Auch die Gruppen Aethylacetat-Tetrachlorkohlenstoff und Methyläthylketon-Propylacetat demonstrieren das ausgezeichnete Auflösungsvermögen der Säule. Dies gilt auch dann noch, wenn die Konzentrationen der Substanzen sich wie 1:10 verhalten. Lediglich bei den später erscheinenden Substanzen, z.B. Dichloraethan-Butylacetat, reichte eine t_R -Differenz von 40 Sek. nicht mehr aus; die Breite der Zacke in Chromatogr. 10 deutet allerdings auf einen Doppelpeak hin. Bei t_R -Differenz von 1' bis 1'30" waren jedoch auch die Substanzen mit längerer Retentionszeit so gut zu trennen, daß zwischen den Zacken fast die Null-Linie wieder erreicht wurde.

Um die Säule auch auf ihre Anwendbarkeit für Spurenanalysen zu überprüfen, wurden für 4 Substanzen unterschiedlicher Retentionszeit die Nachweisgrenzen bei max. belastetem Detektor (Detektorstrom: 400 mA) und 50 μ l wäßriger Probemenge ermittelt. Als Mindestzackenhöhe galten 0,5 cm. Die Nachweisgrenzen lassen sich durch Konzentrieren der Spuren mittels Ausschüttlung noch steigern. Die Werte betragen für:

Substanz	t_R	Nachweisgrenze in gamma u. mg/%	
Aceton	2'22"	0,2	0,4
Chloroform	4'5 "	0,65	1,3
sek.-But.	8'21"	0,75	1,5
Chlorbenzol	13'12"	1,4	2,8

Die Nachweisgrenze nimmt mit steigender t_R stark ab, und zwar etwa im linear-reziproken Verhältnis. Eine Versechsfachung der Retentionszeit bewirkt z.B. ein Absinken der Nachweisgrenze auf ca. 1/7. Besonders für die spät erscheinenden Substanzen war die Nachweisgrenze nicht sehr hoch. Diese Tatsache war neben der Ersparnis an Analysenzeit auch Anlaß für die Forderung, die Retentionswerte möglichst klein zu halten. Um die Nachweisgrenze zu steigern, bestanden 2 Möglichkeiten:

- 1.) Die Verwendung eines FID, (der allerdings während der Zeit der Untersuchungen noch nicht zur Verfügung stand),
- 2.) Konzentrierung der Substanzen durch Ausschüttlung mit kleinen Mengen eines organischen Solvens (s. Abschn.IV.3).

VI. 2) Die Ermittlung einer apolaren Trennkolonne.

Die Auswahl an apolaren stationären Phasen für die Gaschromatographie ist bekanntlich nicht sehr groß. Es stehen im wesentlichen nur Squalan, Silicon- und Paraffinöl zur Verfügung.

Zunächst wurde Siliconöl (Kolonne d. Fa. Beckman) geprüft. Die Retention des Wassers war erwartungsgemäß gering, die

t_R betrug 1'25"; die Wasserzacke war sehr scharf und zeigte kaum eine Schwanzbildung. Dies weist darauf hin, daß weder eine Verteilung noch eine Adsorption in der Säule stattfindet. Überraschend schnell traten auch die anderen polaren Substanzen aus der Säule aus. Iso-Amylöl hatte mit 7'25" eine sehr kurze t_R , auf anderen Säulen betrug die Retentionszeit sonst das 2-3fache. Petroläther, Äther, Benzin wurden erst nach Methanol, Methylchlorid u. Äthanol eluiert, da sie vom apolaren Siliconöl viel länger zurückgehalten werden. Die polaren Alkohole wurden genau in der Reihenfolge der Siedepunkte entwickelt. Dies gilt auch für apolare Substanzen, wie Dichlormethan, Schwefelkohlenstoff, Dichloräthan, Cyclohexan, Tetrachlorkohlenstoff und Benzol. Trotz 20 - 40° C Differenz der Siedepunkte wurden dagegen Methylacetat, Chloroform und sek-Butanol gemeinsam eluiert, als Doppelzacke erschienen auch iso-Butanol (Siedep. 108° C) und Äthyljodid (Siedep. 72,8° C). Schwierig war auf dieser Säule die Analyse von Xylol, Chlorbenzol u. Amylacetat wegen der langen Retentionszeiten. Wie aus Graphik 16 ersichtlich, waren die Substanzen gut in kleine Gruppen aufgetrennt. Da auch das Trennvermögen und die Peakformen ausgezeichnet waren, war die Säule für die Analyse der Substanzen in organischen Lösungsmitteln brauchbar (s. Abschn. VI.3).

Durch die Kombination mit Säule 31 sollte die Selektivität gegen Wasser gesteigert werden. Die t_R von Wasser konnte dadurch soweit verlängert werden, daß der Beginn der Zacke für 50 µl Probe bei 23 Min. und die t_R bei 28 Min. lag.

Die Retentionszeiten waren z.T. beträchtlich verlängert, besonders für die polaren Substanzen, wie z.B. iso-Propanol. Petroläther, Benzin, Äther, Schwefelkohlenstoff, Methylchlorid u. Aceton wurden anders als auf der Siliconölsäule eluiert. Die Retentionswerte von 11 Substanzen, darunter Chloroform, Cyclohexan u. Toluol,

wurden nur unwesentlich beeinflusst. Die Zahl der Substanzen mit langen t_R war um zwei angestiegen, Pyridin und Chloralhydrat konnten auf dieser Säule nicht identifiziert werden. Da die Trennungen zwischen verschiedenen Substanzgruppen nicht ausreichend waren und die Zacken leider eine beträchtliche Schwanzbildung aufwiesen, sollte eine Kombinations säule erprobt werden. In der Säule 27 wurde der Diglycerinanteil etwas niedriger eingestellt, als bei der Säulenkombination, da der apolare Charakter möglichst wenig verändert werden sollte. Die Retention des Wassers war dadurch nicht ganz ausreichend. Der Beginn der Zacke für 50 μ l Probe lag bei 10'50", die t_R bereits bei 12'15". Auch wenn man die Verminderung des Diglycerinanteils berücksichtigt, zeigte die Kombinations säule eine Verschlechterung der Trennung gegenüber den beiden hintereinander gekoppelten Säulen. 11 Substanzen des Trennungsganges lagen wegen ihrer langen Retentionszeiten innerhalb oder hinter der Wasserzacke. Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen an Säule 7 (Beladung: Diglycerin), wo nur wenige Substanzen lange Retentionszeiten haben. Außerdem wurden auch die 4 unteren aliphatischen Alkohole wesentlich früher eluiert, als auf der Säule 7 oder der Siliconölkolonne. Dies sind weitere Hinweise dafür, wie wenig man die Charakteristik einer Kombinations säule aus den Eigenschaften der verwendeten flüssigen Phasen voraussagen kann. Säule 27 genügte also den Anforderungen des Trennungsganges nicht, da sie eine unzureichende Selektivität gegen Wasser aufwies und eine Reihe von Substanzen zu lange Retentionswerte aufwiesen.

Als nächste apolare Phase wurde Paraffinöl überprüft (Säule 28). Die Substanzen zeigten auf dieser Kolonne z.T. eine ausgeprägte Schwanzbildung. Besonders galt dies für die Zacken der polaren Substanzen, wie die der Alkohole, Pyridin, Formaldehyd u. Aceton. In der Reihenfolge der Eluierung zeigte sich ein ähnliches Bild, wie auf der Siliconölkolonne.

Methanol und Aethanol wurden vor Petrolaether, Dichlormethan u. Benzin eluiert. Iso.-Propanol u. Aceton wurden trotz 20° C Siedepunkt-Differenz nicht getrennt. Die Säule zeigte für die polaren Substanzen ein schlechteres Auflösungsvermögen, als die Siliconölkolonne, weswegen für die Analyse der Alkohole in Abschn. VII auch die Siliconölkolonne Verwendung fand. Aethylacetat und Schwefelkohlenstoff erschienen trotz unterschiedlicher Siedepunkte ebenfalls gemeinsam, gefolgt von Chloroform, Aethylmethylketon, sowie 6 anderen Substanzen, darunter Cyclohexan und n-Heptan, ohne daß hier eine Reihenfolge nach Siedepunkten erkennbar gewesen wäre. Eine lange Retentionszeit hatten Paraldehyd und Acetaldehyd und für 6 Substanzen waren die t_R größer als 30 Min. Die Retention des Wassers war naturgemäß sehr gering, wenngleich etwas besser als auf der Siliconölkolonne, die t_R lag bei 2'22" für 50 µl Probe.

Zur Steigerung der Wasserretention wurde eine 0,8 m lange Kolonne vorgeschaltet, die auf Sterchamol 30% Diglycerin enthielt (Säule 28a). Die starke Selektivität des Diglycerins für polare Substanzen bewirkte einen Anstieg der t_R des Wassers auf das 11-fache (t_R : 25'). - Hier war ein ähnlicher Effekt wie bei der Vorschaltung der Diglycerinkolonne vor die Siliconölkolonne zu vermerken. Alle Alkohole zeigten beträchtliche t_R -Verlängerungen. Aethylchlorid, Petrolaether u. Benzin wurden vor den Alkoholen eluiert, iso-Propanol erschien wie bei Säule 7 vor Methanol und Aethanol. Die Trenneigenschaften der Säule waren, wie häufig bei Vorschaltung einer Kolonne vor eine andere, nicht zufriedenstellend. Substanzen, deren t_R rund 1 Min. auseinanderlagen, wurden z.T. nicht voneinander getrennt. So fand keine Auflösung zwischen Aether u. Aceton, Aethanol u. Schwefelkohlenstoff sowie zwischen Aceton u. Schwefelkohlenstoff statt. Auch Aethylmethylketon und Dichloraethan sowie n-Propanol und Cyclohexan wurden nicht getrennt. Für Toluol, Butyl- u. Amylacetat, Chlor-

benzol, Xylol, Pyridin u. Chloralhydrat wurden Retentionszeiten zwischen 14 - 40 Min. gemessen. Für eine Analyse dieser Substanzen war die Säule deshalb völlig ungeeignet.

Um die unzureichende Trennung zu verbessern und die Retentionszeiten zu verkürzen, wurden Paraffinöl und Diglycerin in einem geeigneten Lösungsmittelgemisch gelöst und gemeinsam auf die Trägersubstanz gebracht (Säule 28d, Tab. 14, Graphik 17). Das Retentionsvermögen für Wasser sank ab, der Beginn der Wasserzacke lag für 50 µl Probe bei 13'40", die t_R bei 16'15". Die Trennfähigkeit der Säule stieg wie Chromatogr. 13 zeigt beträchtlich. Eine aus 6 Substanzen bestehende Testlösung, die auf Säule 28a lediglich in 3 Doppelpeaks aufgetrennt war, wurde sehr gut aufgelöst.

Bemerkenswert war eine Anzahl von Veränderungen in der Reihenfolge der Eluierung gegenüber Säule 28a; z.B. zwischen Aceton und Petroläther, iso-Propanol und Äthanol, Äthylmethylketon und n-Propanol. Die Retentionswerte der leicht flüchtigen Substanzen waren unwesentlich verkürzt, an der Reihenfolge der höher flüchtigen apolaren Substanzen, wie Benzol, Trichloraethylen, n-Heptan hatte sich nichts geändert. Für Chloralhydrat war keine sehr scharfe Zacke zu erhalten, wodurch die Anzeigeempfindlichkeit für diese Substanz sehr gering wurde. Die Trenneigenschaften der Säule war ausgezeichnet; weitere Vorteile waren die Verkürzung der Retentionswerte gegenüber der Säule 28a bei gleicher Trägergasmenge sowie die ausgezeichneten Zackenformen. Deshalb wurde die Säule 28d als apolare Trennkolonne für den Trennungsgang ausgewählt.

Die Trenneigenschaften der Säule 28d wurden gleichfalls mit 2 Testlösungen überprüft (Chromatogr. 14 u. 15), t_R -Differenzen von 40 Sek. bis 1 Min. führten zu ausreichenden Trennungen.

Da bisher meist mit reinen Substanzen bzw. organischen Lösungsmitteln gearbeitet wurde, blieb zu klären, ob die ermittelten t_R -Werte auch für den Nachweis der Stoffe in biologischen Flüssigkeiten gelten. Bei diesen Untersuchungen differierten die t_R -Werte nur um 5-20 Sekunden. Es handelte sich also um Abweichungen, die beinahe noch innerhalb der Fehlergrenze der t_R -Bestimmungen lagen.

Da die Seren und Körperflüssigkeiten wieder durch Zugabe von $Pb(NO_3)_2$ enteiweißt werden sollten, mußte außerdem überprüft werden, ob nicht unerwünschte Aussalzeffekte auftraten. Namentlich hydrophobe Substanzen oder Substanzmengen in der Nähe der Nachweisgrenze könnten sich so der Analyse entziehen. Um dies zu überprüfen wurden zunächst wäßrige Lösungen injiziert und die Zackenhöhen registriert. Sodann wurden 2 ml der gleichen Lösung mit 2 ml Serum verdünnt, 520 mg $Pb(NO_3)_2$ dazugegeben, die Mischung geschüttelt, zentrifugiert und eingespritzt. Selbst bei hydrophoben Substanzen, wie Dichlormethan, Dichloraethan, n-Propanol u. Butylacetat betrugen die Zacken dann die Hälfte der ursprünglichen Menge bzw. lagen die Abweichungen innerhalb von $\pm 5\%$. Bei Substanzen, wie Xylol, Toluol u. Benzol, die sich fast gar nicht im Wasser lösen, war jedoch festzustellen, daß ihre Verdünnung häufig bereits unter der Nachweisgrenze lag, so daß es namentlich, wenn diese Substanzen in größeren Mengen vorliegen, und sich dabei sogar zwei Phasen bilden können, ratsam ist, die Probe auszuschütteln.

VI. 3) Die Ausschüttlung der Substanzen des Trennungsganges.

Einer der Gründe, den Trennungsgang noch durch eine Ausschüttlung zu ergänzen, lag in den hydrophoben Eigenschaften der meisten Substanzen des Trennungsganges. Ein weiterer Vorzug beim Ausschütteln war, daß bei Verwendung eines organischen Lösungsmittels die Siliconölkolonne (Fa. Beckman)

verwendet werden konnte, die gegenüber der Säule 28d folgende Vorzüge aufweist: Die Zacken sind steiler und zeigen keine Schwanzbildung, die Trennungen sind noch etwas besser, das Spektrum noch gleichförmiger auseinander gezogen und die Gruppe der wegen zu langer Retentionswerte nicht analysierbaren Substanzen umfaßt 2 Verbindungen weniger. Ferner ist die Siliconölkolonne stärker apolar (Polaritätswert 7) als Säule 28d, da diese durch den Diglyzerinzusatz eine Verminderung des apolaren Charakters erfahren hatte.

Durch eine zusätzliche Ausschüttlung, die nur einen geringen Zeitaufwand erfordert, wird gleichzeitig die Sicherheit des Verfahrens gesteigert, denn es kommt noch ein dritter auf der Silikonölkolonne gewonnener Retentionswert hinzu. Spuren-mengen in der Nähe der Nachweisgrenze können sicherer erfaßt werden. Außerdem läßt sich durch das Ausschütteln eine Anreicherung der Substanzen erzielen, wodurch die Nachweisempfindlichkeit um ca. eine Zehnerpotenz gesteigert werden kann. Wenn sich bei hydrophoben Substanzen, die in höherer Konzentration vorlagen, 2 Phasen bildeten, war zudem eine Ausschüttlung unumgänglich, um eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen. Es wurde eine Reihe von Substanzen als Ausschüttlungsmittel erprobt. Dichlormethan, Dichloraethan, iso-Amylacetat, Chlorbenzol, Toluol, Chloroform und Aether entsprachen jedoch nicht den Anforderungen, da sie entweder zu leicht flüchtig waren, oder ihre Reinheit nicht ausreichte und störende Begleitzacken auftraten. Z.T. waren auch ihre t_R entweder nicht kurz genug oder nicht lang genug, um sie von den zu analysierenden Substanzen sicher abzugrenzen. Als nahezu ideales Ausschüttlungsmittel erwies sich n-Amylacetat (Fa. Fluka, gaschromatographisch auf Reinheit geprüft), das außerordentlich rein war und ferner eine so lange Retentionszeit hatte, daß es bis auf wenige Ausnahmen auf Säule 28d und der Siliconölkolonne später als die übrigen Substanzen eluiert wurde. Da das n-Amylacetat auf Säule 32 schon nach

9 Min. erschien, war die Ausschüttlung für diese Säule weniger geeignet. Bei den auf Säule 32 nach n-Amylacetat erscheinenden Substanzen handelte es sich jedoch um hydrophile Stoffe, die im wäßrigen Milieu ausreichend genau identifiziert werden konnten. Bei der Verwendung von n-Amylacetat ist ein Zusatz von getrocknetem Kaliumcarbonat anzuraten, um auch Spuren von Wasser zu entfernen.

VI. 4) Eichkurven.

Für die quantitative Analyse wichtiger Verbindungen wurden Eichkurven aufgestellt (Graphik 18 - 23). Für Schwefelkohlenstoff, Trichloraethylen, Tetrachlorkohlenstoff u. Acetaldehyd wurden die Eichkurven für die Säule 32 erstellt, für Aether und Chloroform an Säule 28d. Bemerkenswert war die geringe Empfindlichkeit des Detektors für Acetaldehyd, was sich in einer flachen Eichkurve manifestierte. Die Eichkurven für Methanol und Aceton sind in Abschn. V.F,9 enthalten.

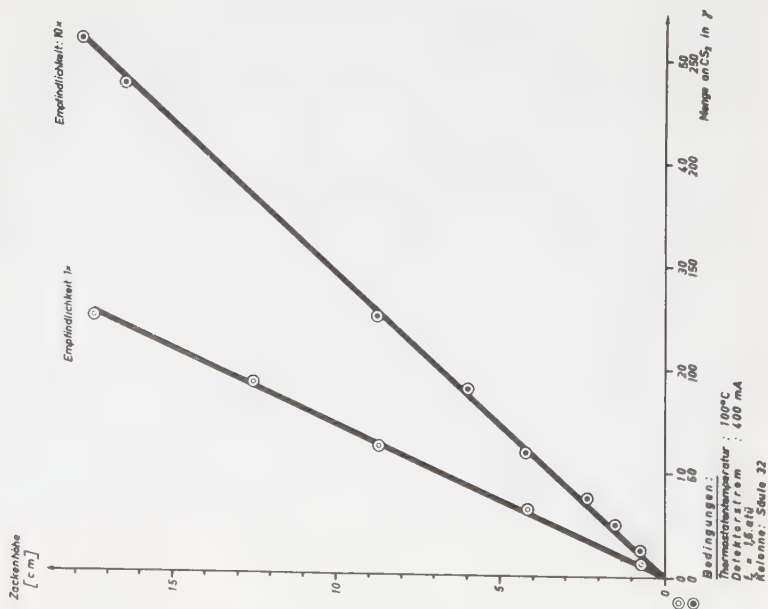
VI.5) Die Auftrennung der Gruppenglieder.

Betrachtet man die Graphiken 15 und 17, so ist ersichtlich, daß der größte Teil der Trennprobleme mit den Säulen 32 und 28d gelöst werden konnte.

Die auf der polaren Säule 32 eng zusammenliegenden Substanzen Petrolaether, Benzin, n-Heptan, Aether, Aethylchlorid, Cyclohexan u. Schwefelkohlenstoff (t_R etwas unter oder über 1 Min.) konnten auf Säule 28d ausreichend differenziert werden. Für Petrolaether und Benzin war typisch, daß sie hier in wesentlich mehr Zacken aufgetrennt wurden als auf der polaren Kolonne. Lediglich Aether war sehr schwer von Petrolaether zu trennen, auch auf den übrigen überprüften Kolonnen war eine Unterscheidung nicht möglich. Doch werden beide Substanzen nur sehr selten gemeinsam angetroffen und das Auftreten von mehreren Peaks an Säule 28d mag für Petrolaether ausreichend spezifisch sein.

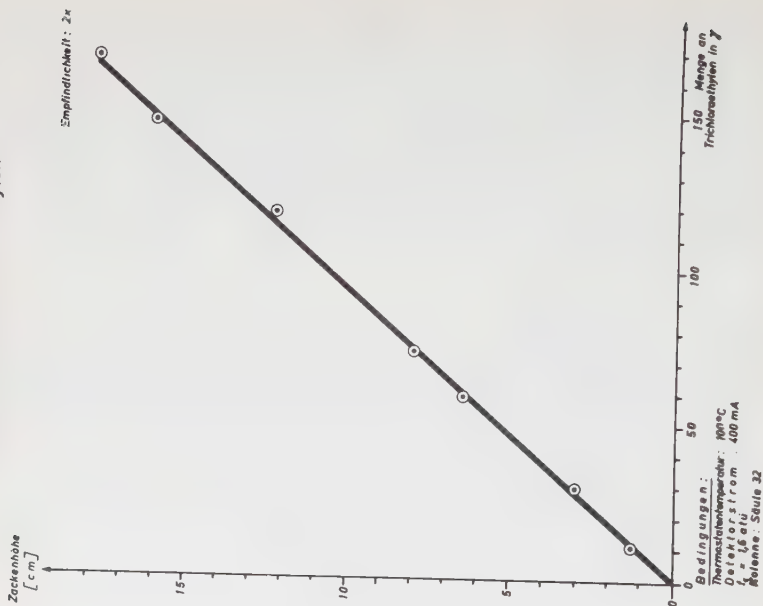
GRAPHIK 18

Eichkurve für Schwefelkohlenstoff



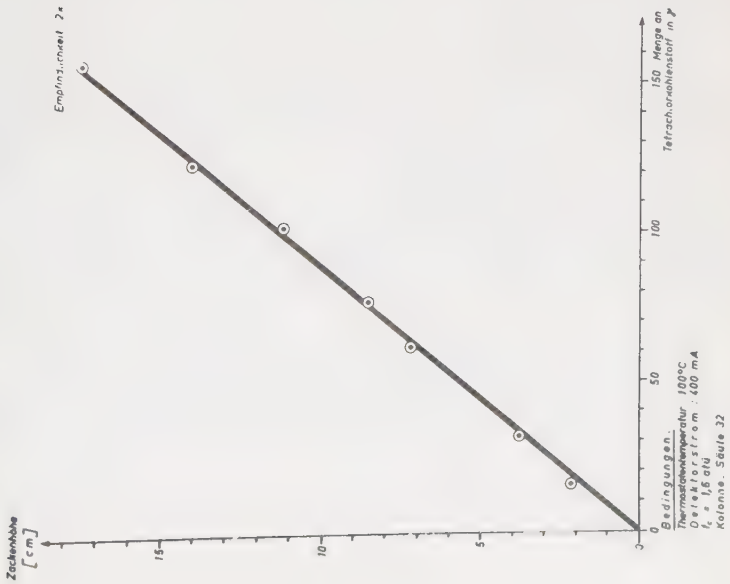
GRAPHIK 19

Eichkurve für Trichloräthylen



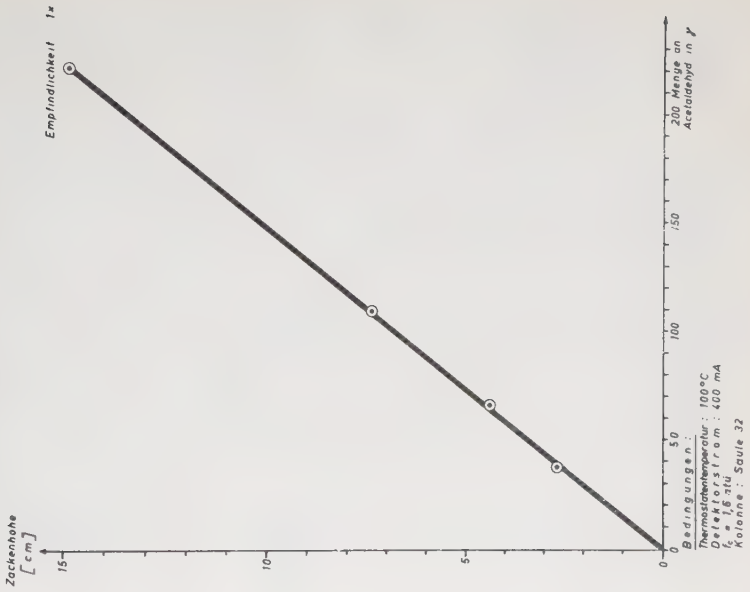
GRAPHIK 20

Eichkurve für Tetrachlorkohlenstoff



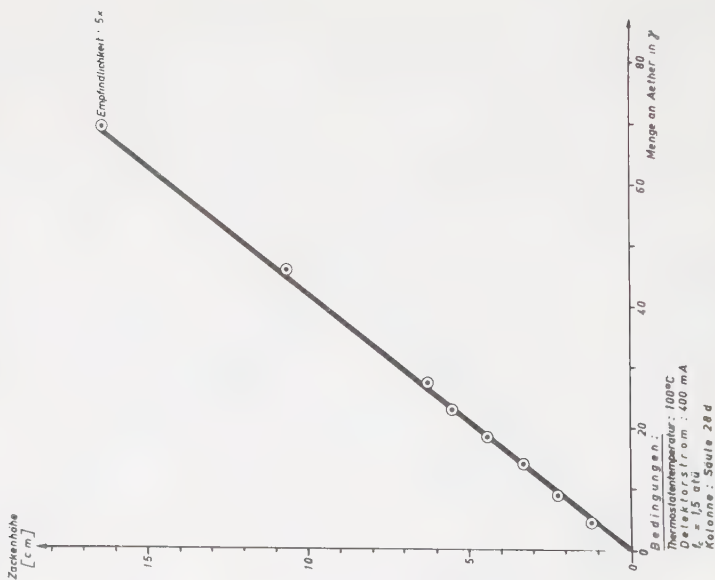
GRAPHIK 21

Eichkurve für Acetaldehyd



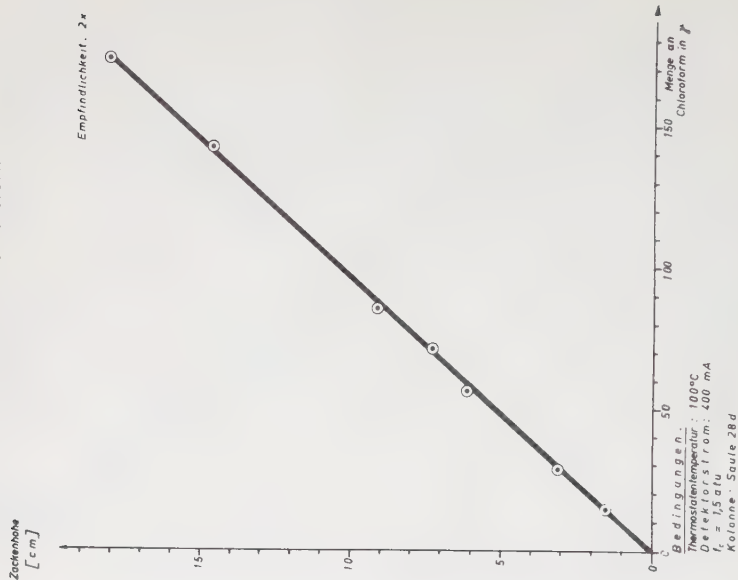
GRAPHIK 22

Eichkurve für Aether



GRAPHIK 23

Eichkurve für Chloroform



Aethylchlorid erschien weit genug vor den übrigen Substanzen auf Säule 28d. Für n-Heptan, Cyclohexan, Schwefelkohlenstoff waren die t_R auf Säule 28d so bedeutend verlängert, daß eine Differenzierung keine Schwierigkeiten bereitete.

Die nächste auf der Säule 32 abgetrennte Gruppe, bestehend aus Tetrachlorkohlenstoff, Aethyljodid, Aceton, Dichlormethan u. Aethylacetat, wurde auf Säule 28d ebenfalls mit anderen t_R -Werten aufgetrennt. Tetrachlorkohlenstoff wurde hier sehr lange zurückgehalten (t_R : 6'24"), während Aceton eine sehr kurze Retentionszeit hatte. Für Aethyljodid u. Aethylacetat war allerdings auch hier nur eine Trennung angedeutet, dergleichen konnten Aceton u. Dichlormethan nicht voneinander getrennt werden, so daß dafür die Verwendung zweier Hilfskolonnen notwendig wurde. Nach Ausschüttelung mit Amylacetat waren Aceton und Dichlormethan auf der Kolonne Nr. 70025 gut zu trennen, während Aethyljodid und Aethylacetat auf der Kolonne 7 (Länge: 3m) ausreichend getrennt wurden.

Die drei nächsten Substanzen auf der Säule 32, Methyläthylketon u. Trichloräthylbenzol, bereiteten auf der Säule 28d keine Schwierigkeiten, da ihre Retentionswerte 2 - 3 Min. auseinanderlagen.

Tert.-Butanol, Chloroform, Propylacetat auf Säule 32 als Dreifachzacke erscheinend, hatten auf Säule 28d ebenfalls t_R -Differenzen von 1-3 Min. Chloralhydrat war auf beiden Säulen nicht sehr gut zu bestimmen, es zeigten sich nur flache Zacken mit langer Schwanzbildung. Vielleicht spielte auch eine thermische Zersetzung eine Rolle. Mit ausreichender Genauigkeit könnte diese Substanz nur mit Hilfe des Flammenionisationsdetektors detektiert werden.

Toluol, Methanol, iso-Propanol sowie Formaldehyd wurden auf der Säule 32 gemeinsam eluiert. Eine Trennung von Methanol und Formaldehyd war weder auf der Säule 28d noch auf anderen getesteten Kolonnen möglich. Die Retentionszeit von Toluol da-

gegen war auf der Säule 28d sehr stark verlängert (t_R : 14'5"). Methanol und iso-Propanol konnten auf der Säule 7 (Länge: 3m) oder nach Ausschüttlung auf der Siliconölkolonne unterschieden werden.

Dichloräthan-Äthanol sowie Butylacetat - (Par-) Acetaldehyd wurden auf der Säule 32 als Doppelzacken eluiert, konnten jedoch auf der Säule 28d glatt voneinander getrennt werden.

Von der Gruppe Xylol, sek.-Butanol, iso-Amylacetat konnte nur sek.-Butanol auf der Säule 28d leicht abgetrennt werden, während Xylol und iso-Amylacetat hier zu lange t_R hatten. Ihre Identität kann aber durch t_R -Vergleich auf der Säule 7 (Länge: 3 m) gesichert werden. - Auf der Säule 32 sind nur 3 Substanzen wegen ihrer hohen t_R -Werte nicht gut zu identifizieren; es sind dies: n-Butanol, iso-Amylöl und Pyridin. Chlorbenzol konnte trotz langer Retentionszeit gerade noch ermittelt werden; zur Verifizierung wird am besten ebenfalls Säule 7 (Länge: 3m) herangezogen. Da Pyridin auf Säule 28d nicht zu bestimmen war, sollte es in einer späteren Arbeit mitbestimmt werden, die sich mit der Analyse einer zweiten Substanz-Gruppe von verschiedenen hochsiedenden Verbindungen (Lackverdünner, Anilin usw.) befassen wird. Die Detektion von n-Butanol und iso-Amylöl, die wegen ihrer Polarität und hohen Siedepunkte auf Säule 32 lange Retentionswerte hatten, bereitete auf Säule 28d keine Schwierigkeiten.

Von einigen Ausnahmen abgesehen, konnten so alle Substanzen des Trennungsganges mit der Kombination von Säule 32 und 28d erfaßt werden. Für einige Fälle müssen die bezeichneten Hilfskolonnen zur Identifizierung herangezogen werden.

Der entwickelte Trennungsgang wurde auf einige Vergiftungsfälle mit hohen Aceton- und Methanolgehalten in Blut und Organen angewendet. Die Identifizierung erfolgte durch t_R -Vergleich auf den Säulen 32, 28d, 25 und 31, sowie durch Mischchromato-

gramme. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels der in Abschnitt V.F,9 angegebenen Eichkurve. Die Ergebnisse wurden noch durch die Chromotropsäure-Reaktion und die Probe nach Legal abgesichert.

Bei einer Trichloraethylenvergiftung, bei der nur geringe Mengen der Substanz aufgenommen worden waren, konnte im Blut und Harn dagegen kein Trichloraethylen gefunden werden. Wahrscheinlich war bereits alles in Abbauprodukte umgewandelt, die eine positive Probe nach Fujiwara zeigten.

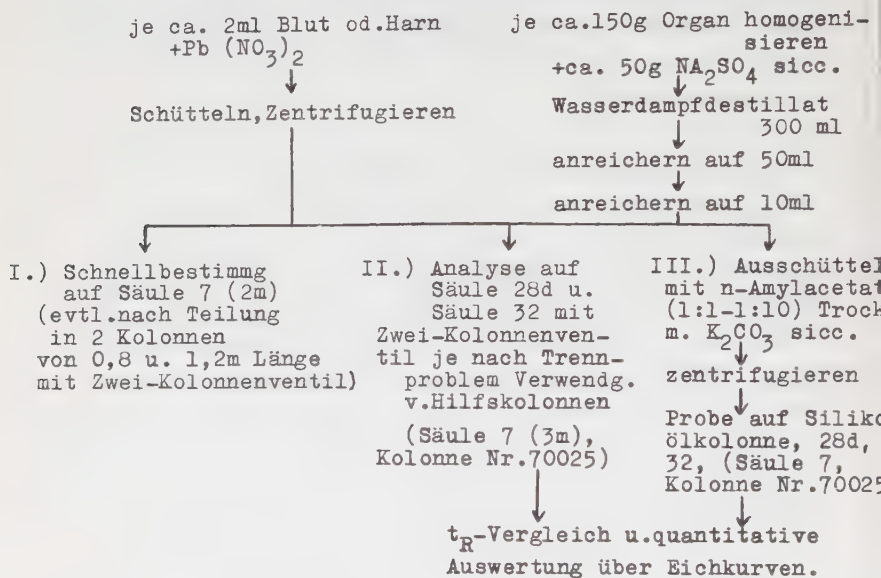
VI.6) Eine Kolonne für die Schnellanalyse.

Eine weitere Anwendung des erarbeiteten Trennungsganges beruht auf der Verwendung der Säule 7 in verkürzter Form (Länge: 2m) für Ausschluß-Analysen, denn bei dieser Säule brechen die 38 Substanzen des Trennungsganges innerhalb von 7'35" durch. Die außerordentlich kurze Analysenzeit geht natürlich auf Kosten der Trennungen, reicht aber für eine Ausschlußbestimmung aus. Nur 2 Substanzen, nämlich Pyridin und Chloralhydrat haben auch auf dieser Säule zu lange Retentionswerte. Die kurze Analysenzeit beruht darauf, daß Diglycerin eine stark polare Verbindung ist, während die meisten Substanzen des Trennungsganges apolar sind (s. Tab. 14).

Die kurzen Retentionswerte der Substanzen und die lange Retentionszeit des Wassers konnten zu einer weiteren Vereinfachung ausgenutzt werden. Nach Aufteilung der 2m-Säule 7 in ein 0,8m und ein 1,2m langes Stück und Einfügung eines Zweikolonnenventils zwischen die Teile konnte durch Abfangen des Wassers in der kürzeren Säule und nachfolgendes Rückspülen bei erhöhtem Druck Analysenzeit eingespart und etwa 3-4 Schnell-Analysen in der Stunde durchgeführt werden.

VI. 7) Schema des Trennungsganges.

Unter zusätzlicher Verwendung von Säule 7 (Länge: 2m) und der in Abschn.VI.3 vorgeschlagenen Ausschüttlung der Substanzen ergibt sich für den gesamten Trennungsgang das folgende Schema:



In den Trennungsgang können jederzeit weitere flüchtige Substanzen aufgenommen werden.

Durch Verwendung eines Flammenionisationsdetektors könnte der Trennungsgang auch für Spurenanalysen angewendet werden. Da als flüssige Phasen für Säule 32 u. 28d nur Diglycerin, Polyglycol und Paraffinöl Anwendung finden, deren Temperaturgrenzen ziemlich hoch sind und die somit durch Abdampfen kein "Rauschen" im empfindlichen FID hervorrufen, wäre wahrscheinlich ein Wechsel der flüssigen Phasen und eine Änderung der Konzentration ihrer Beladung nicht erforderlich.

VII.) Feststellung von toxisch wirkenden Substanzen bei Alkoholvergiftungen.

Bei Todesfällen unter Beteiligung von Aethanol werden öfter Blutalkohol-Gehalte von 1,5 - 3 ‰ beobachtet, die für sich allein nicht ohne weiteres zur Erklärung des letalen Ausganges ausreichen. Da in manchen Fällen zu vermuten war, daß noch andere flüchtige Begleitsubstanzen mit höherer Toxizität, wie z.B. die Fuselalkohole, beteiligt sein konnten, wurden entsprechende Untersuchungen vorgenommen. Wegen der zu erwartenden geringen Gehalte dieser Stoffe wurde hier erstmals der Flammenionisations-Detektor (FID) benutzt, der eine hohe Empfindlichkeit der Detektion aufweist.

Über die Anwendungsmöglichkeiten eines FID berichteten JENTSCH u. FRIEDRICH (127); sehr ausführlich ging auch SCHOMBURG (30) auf den FID ein. Betrachtungen über den Wirkungsmechanismus des FID stellte DEWAR (128) an. Die Ionisation spielt sich im inneren Flammenkegel ab, je höher die Oxidationsstufe der Kohlenstoff-Verbindung ist, desto geringer ist die Ansprechbarkeit des Detektors. Demnach scheint die Möglichkeit zur Oxidation eine wesentliche Voraussetzung für die Bildung eines ausreichenden Ionisationsstromes zu sein.

Über die Analyse von Fuselalkoholen im Zusammenhang mit deren Neubildung im Blut bei Fäulnis berichteten WEINIG u. Mitarbeiter. Neben mikrochemischen Reaktionen wurde auch die Gaschromatographie herangezogen (80, 81, 129). SCHWERD u. GARHAMMER (130) beschrieben einen mikrochemischen Nachweis für Fuselalkohole in faulendem Blut. Auch RODIER (131) führte Untersuchungen über die Neubildung von Alkoholen bei Fäulnis aus. Er beschrieb die Zunahme des Methanol- u. Aethanolgehaltes, machte aber keine Angaben über höhere Alkohole. Auch WOLTHERS (132) analysierte gaschromatographisch postmortal gebildete Alkohole.

Andere Autoren berichteten über den Gehalt an Fuselölen in Getränken. JAROSCH (133) teilte mit, daß in minderwertigen Kornschnäpsen bis zu 1,26% Gesamt-Fuselöle enthalten sind, vor allem iso-Butanol u. Amylole. Da diesen Getränken eine stärker berauschende Wirkung zukommt, forderte er, diese Tatsache bei der Begutachtung zu berücksichtigen.

GRAB (134) befaßte sich mit den pharmakol. Problemen bei Wein und Spirituosen. In Pflaumenschnaps kommen bis zu 500 mg% Amylole vor, der Methanol-Gehalt von Obstweinen betrug ebenfalls bis zu 0,5 % . SPECHT (Lit. bei 135) hält dagegen die Gehalte an Fuselölen in Markenspirituosen für gering, der Methanolgehalt in vielen minderwertigen Getränken ist allerdings auch seiner Ansicht nach nicht unbeträchtlich. Da aus den Literaturangaben hervorging, daß die Gehalte an Fuselölen bei minderwertigen Spirituosen beträchtlich waren, und diese Getränke besonders von chronischen Trinkern genossen werden, wurden die Ermittlungen auf toxisch wirkende Stoffe bei Alkoholvergiftungen speziell auf die Analyse der niederen aliphatischen Alkohole bis C_5 abgestellt. Da das Untersuchungsmaterial jedoch nicht chemisch aufbereitet wurde, wäre auch der Nachweis anderer Substanzen möglich gewesen.

VII. 1) Wahl des Trägergases und Einstellung optimaler Versuchsbedingungen.

Zunächst bestand die Absicht, auf ein besonderes Trägergas zu verzichten und Wasserstoff gleichzeitig als Brenn- und Schleppegas zu verwenden. Damit wären die Beschaffung eines neuen Trägergases sowie die Schwierigkeiten entfallen, die bei Verwendung mangelhaft gereinigter Gase durch Erhöhung des "Rauschens" auftreten können. Die ausschließliche Verwendung von H_2 hätte jedoch große Nachteile gehabt. Es hätte vor allen Dingen auf die getrennte Einstellung von Träger- und Brenngas verzichtet werden müssen.

Einige orientierende Vorversuche zeigten, daß eine gleichzeitige optimale Einstellung bei alleiniger Verwendung von H_2 als Brenn- und Schleppegas nicht möglich war. Entweder war die Einstellung des H_2 als Schleppegas optimal, dann floß derart viel H_2 durch den Brenner, daß die Anzeigeempfindlichkeit des Gerätes auf minimale Werte absank; oder es lag die Einstellung des H_2 -Stromes als Brenngas im günstigen Bereich, dann floß aber derart wenig Schleppegas durch die Säule, daß sehr lange Retentionszeiten resultierten. Dies sprach gegen die von JOHNS (20) erwähnte alleinige Verwendung von H_2 .

Da die Edelgase wegen ihres hohen Preises nicht in Frage kamen, war die Auswahl des Trägergases stark eingeschränkt. Die Wahl fiel auf Stickstoff (Fa. Linde, Gehalt über 99,5%). Als Brenngas wurde Wasserstoff (Fa. Linde) verwendet, als Sauerstofflieferant diente synthetische Luft. (Fa. Linde).

Bei Vorversuchen am Gerät zeigte sich, daß ein Null-Punktgleich nicht ohne weiteres möglich war. Die Null-Punktunterdrückung mußte bei den verwendeten Säulen nicht, wie am Gerät vorgesehen, 30 V betragen, sondern für die Säulen 8b und die Siliconölkolonne auf 315 V, und für die Säule 21f sogar auf 420 V erhöht werden. Außerdem zeigte sich ein enorm hoher "noise" bei maximaler Empfindlichkeit des Detektors für alle verwendeten Säulen. Eine Verbesserung des "noise" gelang jedoch durch 48-stündiges Ausheizen unter starkem Stickstoffstrom bei $130^{\circ} C$.

Sodann wurde der Einfluß der durch den Detektor strömenden Mengen der Gase auf die Null-Punkteinstellung untersucht. Generell verminderte eine Steigerung des Durchflusses aller drei Gase die Abgleichbarkeit der Null-Linie.

Den stärksten Einfluß hatte dabei das Trägergas. Eine Steigerung des N_2 -Vordruckes auf über 2 atü war trotz hoher Null-Punktunterdrückung bei keiner Säule möglich, da dann überhaupt keine Null-Linie mehr einstellbar war. Der Einfluß des

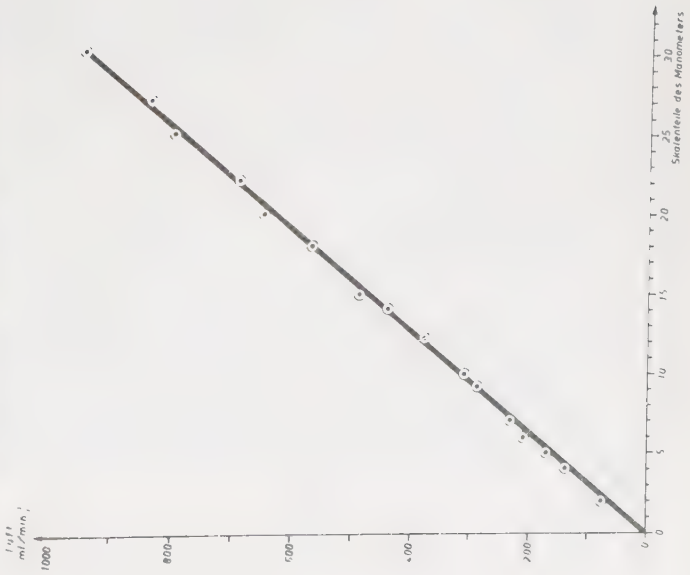
Brenngases H_2 war wesentlich schwächer. Eine Steigerung auf die maximale Menge (30 E. d. Skala = 245ml/min.) konnte ohne weiteres abgeglichen werden; die untere Grenze für das Brenngas lag bei 5 E. = 28 ml/min., da unter diesem Wert die Flamme erlosch und keine Anzeige mehr erfolgen konnte. Noch wesentlich schwächer war der Einfluß des Luftdurchflusses. Trotz Steigerung auf die maximale Menge war nur eine ganz unwesentliche Beeinflussung des Null-Punktabgleichs zu beobachten.

Weitere Vorversuche galten dem Einfluß des Träger- und Brenngases sowie des Luftdurchflusses auf die Anzeigeempfindlichkeit des Detektors. Wie aus Literaturangaben (SCHOMBURG, 30; JENTSCH u. FRIEDRICH, 127) hervorging, sollte ein scharfes Optimum für den Brenngasdurchfluß und ein breiteres Optimum für den Luftdurchfluß existieren. Um diese optimalen Bedingungen herauszufinden, mußten zunächst Eichkurven für den Luft- und H_2 -Durchfluß hergestellt werden (Graphik 24 u. 25), d.h. die am Zusatzgerät befindlichen Manometer geeicht werden. Dies geschah durch Einleiten der Gase bei variiertem Druck in eine pneumatische Wanne.

Zunächst wurde der Einfluß des Brenngases H_2 auf die Anzeigeempfindlichkeit des Brenners untersucht. Zu diesem Zwecke wurden stets gleiche Mengen einer 3 %o Aethanol enthaltenden Lösung injiziert, und alle Versuchsbedingungen (s. Graphik 26) bis auf den H_2 -Durchfluß konstant gehalten. Aus Graphik 26 ist ersichtlich, daß die Einstellung des H_2 -Durchflusses von außerordentlicher Wichtigkeit ist, will man eine maximale Ausnutzung des Detektors erreichen. Die Kurve zeigt ein scharf ausgeprägtes Optimum bei etwas über 10 E. H_2 . Bei diesem Wert sind die Zacken am höchsten und schärfsten, was maximale Empfindlichkeit bedeutet und die quantitative Auswertung nach der Zackenhöhen-Methode begünstigt. Wie aus der Kurve abgelesen werden kann, bewirkt eine geringfügige Stei-

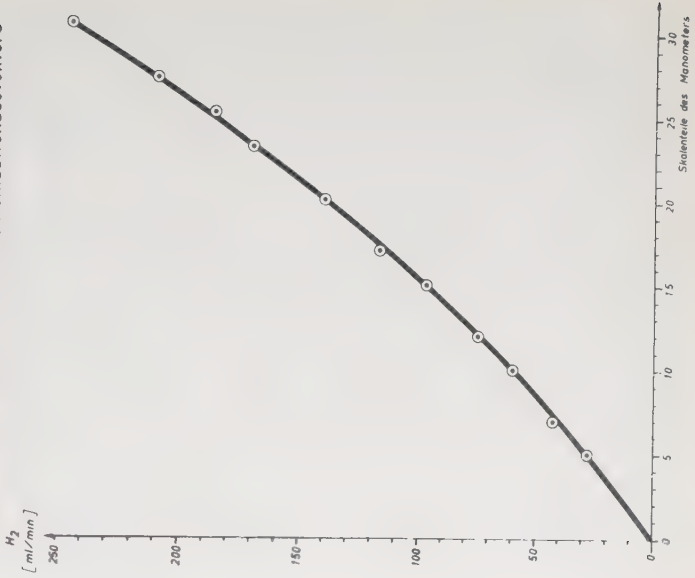
GRAPHIK 24

Eichkurve für den Durchfluß von Luft
durch den Brenner des Flammenionisationsdetektors



GRAPHIK 25

Eichkurve für den Durchfluß von Wasserstoff
durch den Brenner des Flammenionisationsdetektors



gerung des H_2 -Durchflusses um 26 ml/min. von 6 E. auf 10 E. eine Verdoppelung der Zackenhöhe und der Nachweismöglichkeit. Eine Steigerung des H_2 -Durchflusses auf das 3-fache des Optimalen (30 E. = 245 ml H_2 /min. aus Graphik 24 entnommen) hat ein Absinken der Empfindlichkeit auf nur 3 % des Maximalwertes zur Folge.

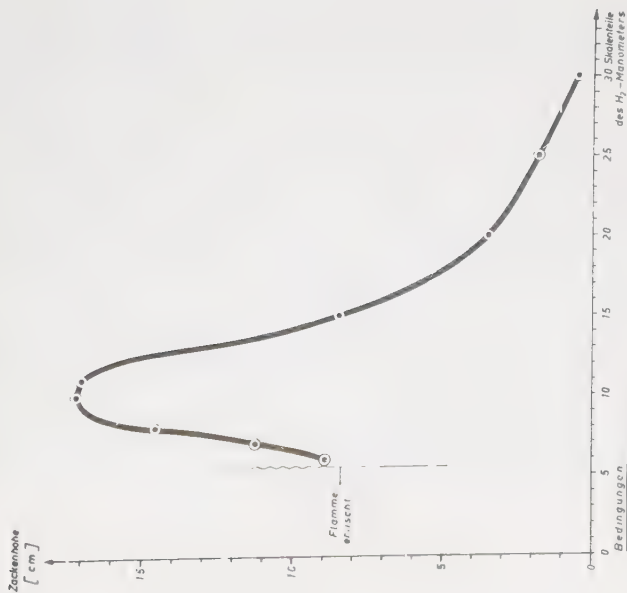
Bei allen weiteren Versuchen wurde mit einem optimalen H_2 -Durchfluß durch den Detektor gearbeitet. Um die Einstellung leicht reproduzieren zu können, wurde genau auf die 10 E.-Marke eingestellt, obwohl dieser Wert geringfügig unter dem Optimum lag. Der relativ geringe H_2 -Durchfluß von 60 ml H_2 /min. kam außerdem der Abgleichbarkeit des Gerätes zugute.

Um den Einfluß der Luft auf die Empfindlichkeit des FID zu bestimmen, wurden die obigen Versuche unter völlig gleichen Bedingungen wiederholt, nur daß jetzt der H_2 -Strom konstant auf 10 E. gehalten wurde, während der Luftdurchfluß durch den Brenner verändert wurde. Wie aus Graphik 27 ersichtlich, ist die Einstellung der Luft von ungleich geringerem Einfluß auf die Empfindlichkeit des FID. Im Bereich zwischen 10 u. 30 E. (310 - 950 ml/min. aus Graphik 23 entnommen) variierte die Zackenhöhe nur um ca. 4%. Der Luftdurchfluß wurde deshalb bei allen folgenden Versuchen auf 20 E. eingestellt (= 647 ml/min.), ein Wert, der im optimalen Bereich lag.

Wie aus einigen orientierenden Versuchen über den Einfluß des N_2 -Durchflusses hervorging, erbrachte die Variation der f_c für N_2 ungefähr die gleichen Ergebnisse wie beim Arbeiten mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da der Trägergasstrom von entscheidender Bedeutung für die Verteilung der Substanzen ist, während sich der Durchfluß von Luft und H_2 ja nur bei der Anzeige der Substanzen bemerkbar macht. Der Stickstoffdurchfluß wurde dann jeweils so eingestellt, daß die Zackenformen möglichst scharf waren und die Analysenzeiten so kurz wie möglich wurden, ohne

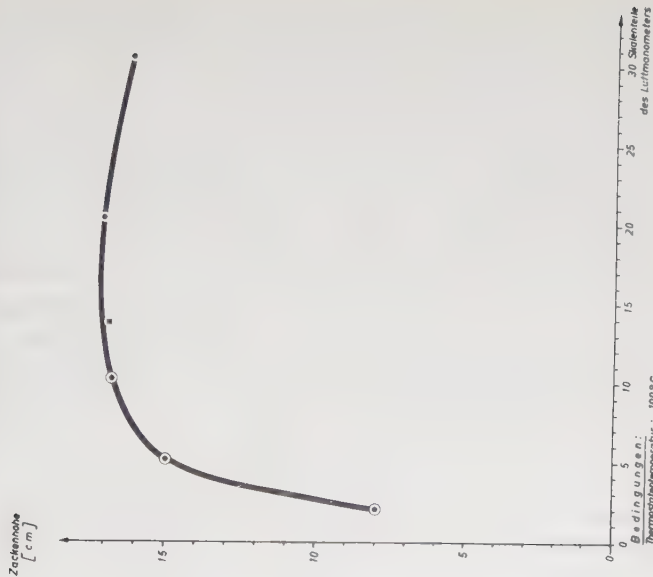
GRAPHIK 26

Abhängigkeit der Zackenhöhe vom H_2 -Durchfluß beim FID



GRAPHIK 27

Abhängigkeit der Zackenhöhe vom $Luft$ -Durchfluß beim FID



daß infolge der großen f_c des N_2 die ohnehin hohe Null-Punktunterdrückung noch weiter gesteigert werden mußte.

Die Reproduzierbarkeit der Detektion wurde mit einer Testlösung mit ca. 3 %o Aethanol überprüft, die insgesamt 30mal unter gleichen Bedingungen eingespritzt wurde. Da der FID viel störanfälliger ist, als der WLD, konnte von vornherein keine so gute Reproduzierbarkeit erwartet werden. Um einen direkten Vergleich zwischen FID und WLD zu erhalten, wurde in einem Empfindlichkeitsbereich gemessen, der bei beiden Detektoren ähnlich ist. Die dreifache mittlere quadratische Abweichung ($3s$) betrug $\pm 4,1$ %, lag also über dem für den WLD auf S. 20 mitgeteilten Wert. Bei maximaler Empfindlichkeit des Detektors ist die Reproduzierbarkeit noch beträchtlich schlechter; wie spätere Versuche bestätigen, lag die Streuung bei der Empfindlichkeit 50×1 bei ca. ± 25 %.

Zur Feststellung der Nachweisgrenze für Aethanol wurde eine sehr stark verdünnte Lösung benutzt, die aus einer 2 %igen Testlösung hergestellt wurde. Die Null-Linie war bei der Empfindlichkeit von 50×1 bei dem verwendeten 1,5 mV-Schreiber bereits sehr unruhig, die Spontanausschläge hatten eine Höhe von bis zu 2 cm. Ein sicherer Nachweis konnte nur dann erfolgen, wenn die Zackenhöhe mindestens das 3-fache des maximalen "Rauschens" betrug (6 cm). Es konnten mit der Empfindlichkeit 50×1 auf der Säule 8b noch $2/1000 \gamma$ Aethanol nachgewiesen werden, was einer 0,00004%-igen Lösung entspricht. (Arbeitsbedingungen: Thermostatentemp. 100°C ; Probe $50 \mu\text{l}$; $f_c\text{-}N_2 = 1,5 \text{ atü}$; $f_c\text{-}H_2$: 10 E.; $f_c\text{-Luft}$: 20 E.). Für Substanzen mit längeren Retentionswerten sank die Nachweisgrenze auch hier gesetzmäßig ab, da sich flachere Gipfel nicht so gut markieren wie scharfe Zacken.

VII. 2) Die Auswahl der Säulen.

Bei den Untersuchungen auf Fuselalkohole bestand das Trennproblem in der Auflösung der aliphatischen Alkohole von Methanol bis iso-Amylol. Diese Trennung sollte im wäßrigen Medium und falls möglich an nur einer oder zwei Säulen vorgenommen werden. Gleichzeitig sollten die Befunde wieder durch die Retentionszeiten an einer zweiten Säule unterschiedlicher Polarität verifiziert werden. Bei der Auswahl der Säulen konnte auf die bereits in Abschn. V.D entwickelten Säulen zurückgegriffen werden. Jedoch zeigte sich, daß die Benutzung der gleichen Säulen, die mit dem WLD ausgezeichnete Ergebnisse gebracht hatten, bei den Untersuchungen mit dem FID nicht möglich war. Die Null-Linie ließ sich bei den mit 30% flüssiger Phase beladenen Säulen nicht abgleichen. Da der Schleppgasmengenstrom, wie ermittelt, einen starken Einfluß auf die Abgleichbarkeit des Gerätes hatte, sollte die f_c des Stickstoffs verkleinert werden. Um den Schleppgasmengenstrom vermindern zu können, und trotzdem die Analysenzeiten nicht ansteigen zu lassen, wurde die Stärke der Beladung in den Säulen herabgesetzt. Gleichzeitig mußte sich eine Verminderung der flüssigen Phase auch günstig auf den Störpegel des Detektors auswirken, da nicht so viel flüssige Phase abdampfen konnte.

Es wurde eine neue Säule 8a hergestellt, die nur eine Beladung von je 2,5 % Polyglykol und Diglycerin enthielt. Bei der Überprüfung mit einer wäßrigen Testlösung der zu analysierenden Alkohole wurde festgestellt, daß die Retentionszeiten sich schlecht reproduzieren ließen, die Retentionszeiten schwankten bis zu $\pm 10\%$. Außerdem wurden die t_R von der Höhe der Probemenge stärker beeinflusst, als bei Säulen mit höherer Beladung. Die Trennungen waren vermindert, Methanol u. Aethanol traten jetzt gemeinsam mit sek.-Butanol aus der Säule. Wurden kleine Mengen Methanol mit Hilfe der Hamilton-Mikrospritze injiziert, so streuten die Retentionswerte umso stärker,

je kleiner die Probemengen wurden. Kleinere Mengen Methanol (unter 0,1 μ l) konnten überhaupt nicht wieder detektiert werden.

Diese Erscheinungen waren nur so zu deuten, daß bei Säulen, deren Beladung an flüssiger Phase etwa 5 % beträgt, bereits Adsorptionseffekte auftreten, da die Beladung nicht mehr ausreicht, die aktive Oberfläche zu bedecken. Die Chromatographie stand an der Grenze zwischen Adsorption und Verteilung (Übergang zwischen GAC und GVC).

Namentlich für Spurenanalysen durfte jedoch nicht die geringste adsorbierende Oberfläche vorhanden sein, da sich die geringen Konzentrationen sonst dem Nachweis entzogen hätten. Andererseits sollte die Beladung so gering wie möglich sein, da sonst ein zu hoher f_c des Trägergases zur Erzielung niedriger Analysenzeiten nötig gewesen wäre und ein Null-Punktabgleich erschwert worden wäre. Eine höhere Beladung hätte auch zu einer Verstärkung des bereits beträchtlichen "Rauschens" geführt.

Deshalb wurde die Säule 8b hergestellt, bei der die Beladung ausreichend war. Auch mit kleinen Probemengen war eine ausgezeichnete Trennung der 9 Alkohole mit Ausnahme von Methanol und Aethanol zu erzielen (Chromatogr. 16). Die Trennung war im wäßrigen System geringfügig vermindert, die Säule wurde deshalb nur maximal mit 20 μ l wäßriger Probe belastet, um eine Überladung zu vermeiden. Bei 5 - 20 μ l Probe war die Trennung auch im wäßrigen Milieu ganz ausgezeichnet (Retentionszeiten s. Tab. 15).

Für die Auftrennung von Methanol und Aethanol wurde auf die bereits erprobte Säule 24 zurückgegriffen. Die Beladung der Säule war jedoch auch hier zu groß, und es mußte die Konzentration der flüssigen Phase und das Verhältnis ihrer Anteile zueinander geändert werden. Zur Anwendung kam die Säule 21f. Wie aus den Retentionszeiten (Tab. 15) sowie aus Chromatogr. 17

hervorgeht, war die Trennung nunmehr sehr zufriedenstellend. Allerdings mußte infolge des höheren Diglyceringehaltes ein Heranrücken der Methanol- an die Aethanolzacke in Kauf genommen werden. Es wurde jedoch darauf verzichtet, durch Herabsetzung des Diglyceringehaltes die Trennung zu verbessern, weil dadurch die Belastungsfähigkeit für Wasser abgesunken wäre. Der Beginn der Wasserzacke lag bei 9 Min., die t_R bei 11'30". Die Säule war bis 20 μ l mit Wasser belastbar, und es war keine Adsorption zu beobachten.

Für die apolare Kolonne wurde Siliconöl als stationäre Phase gewählt, da es einen höheren Siedepunkt und einen niedrigeren Dampfdruck im Vergleich zu Paraffinöl besitzt und damit den Vorteil einer höheren Temperaturgrenze und eines niedrigeren Störpegels beim FID hat. Zunächst wurde Säule 27a überprüft (Beladung: Diglycerin-Siliconöl/Sterchamol). Erwartungsgemäß zeigte sich keine gute Auftrennung der polaren Alkohole. Die Säule sollte jedoch nur dazu dienen, die auf den beiden polaren Säulen 21f und 8b ermittelten Ergebnisse abzusichern. Ferner war es nicht wahrscheinlich, daß sich gleichzeitig alle Fuselalkohole bei einer einzigen Intoxikation finden würden. Wie aus Chromatogr. 18 hervorgeht, wurden Methanol, Aethanol, iso-Propanol u. tert.-Butanol nicht getrennt, n-Propanol und sek.-Butanol erschienen als Doppelzacke. Die Säule war bis zu Probemengen von 30 - 40 μ l wäßriger Lösung belastbar.

Beim Vergleich der Chromatogr. 5 und 18 ist erkennbar, wie weit die Trennfähigkeit des Silikonöls durch den Diglycerinzusatz abgesunken ist. Auf der Silikonölkolonne wurde das Gemisch von 8 Alkoholen in 7 Zacken aufgetrennt, während auf Säule 27a eine aus 4 Alkoholen bestehende Zacke, sowie eine Doppelzacke erschien. Deshalb war es doch besser, die Verifizierung der Alkohole erst nach Ausschüttlung an der Silikonölkolonne vorzunehmen. Je 2 ml Analysenmaterial wurden mit 1 ml n-Amylacetat (Fa. Fluka) ausgeschüttelt, 1 - 2 g getrocknetes

Kaliumkarbonat hinzugefügt und 5 Min. bei 3000 U./min. zentrifugiert. Da das verwendete noch zweimal durch Destillation rektifizierte und gaschromatographisch geprüfte n-Amylacetat sehr rein war, war es bis zur Empfindlichkeit 5×10^2 ohne störende Nebenzacken zu benutzen. Dieses Verfahren hatte außerdem den Vorteil, daß durch das Ausschütteln eine Anreicherung der Proben im Verhältnis 1:2 erfolgte.

Tabelle 15

^t_R auf

Substanz	Säule 8b	Säule 21f	Säule 27a	Silikonölkolonne
Methanol	3'24"	3'31"	3'	1'57"
Aethanol	3'40"	4'27"	3'13"	2'32"
iso-Propanol	3'7 "	5'18"	3'6 "	3'47"
n-Propanol	5'45"	8'58"	4'54"	4'25"
sek-Butanol	4'45"	10'14"	5'3 "	5'23"
tert-Butanol	2'42"	5'36"	3'	-
iso-Butanol	6'25"	13'44"	6'11"	5'27"
n-Butanol	9'13"	-	8'27"	6'20"
iso-Amylol	11'50"	-	11'33"	8'26"

Arbeitsbedingungen (zu Tab. 15)

	Säule 8b	Säule 21f	Säule 27a	Silikonölkolonne
Thermosta- tentemp.	100° C	100° C	100° C	100° C
f _c	1 atü = 57 ml/min.	1,4 atü = 83 ml/min.	1,1 atü = 55 ml/min.	1 atü
Detektor- strom	300 mA	300 mA	380 mA	250 mA

Trärgas: N₂

Probe: jeweils 5 µl Reinsubstanz

VII. 3) Eichkurven.

Es wurden die Eichkurven für die wichtigsten Alkohole sowie für Aceton aufgestellt (Graphik 28 - 32). Die Testmengen wurden auf der Analysenwaage gewogen und die Stammlösungen sowie die entsprechenden Verdünnungen mit Aqua bidest. aufgefüllt. Die Eichkurven für Aethanol und Methanol beziehen sich auf die Säule 2lf, die der übrigen Alkohole und Aceton auf Säule 8b. Wie aus den Eichkurven ersichtlich ist, streuen die Werte z.T. beträchtlich. Sie liegen im Bereich der Empfindlichkeit von 20×10^4 - 1×10^4 noch recht gut beisammen. Die Streuungen wurden jedoch mit der Abnahme der Gehalte rasch größer, so daß bei den unteren Empfindlichkeiten von 20×10^2 - 50×10 nicht mit allzu genauen Ergebnissen gerechnet werden darf.

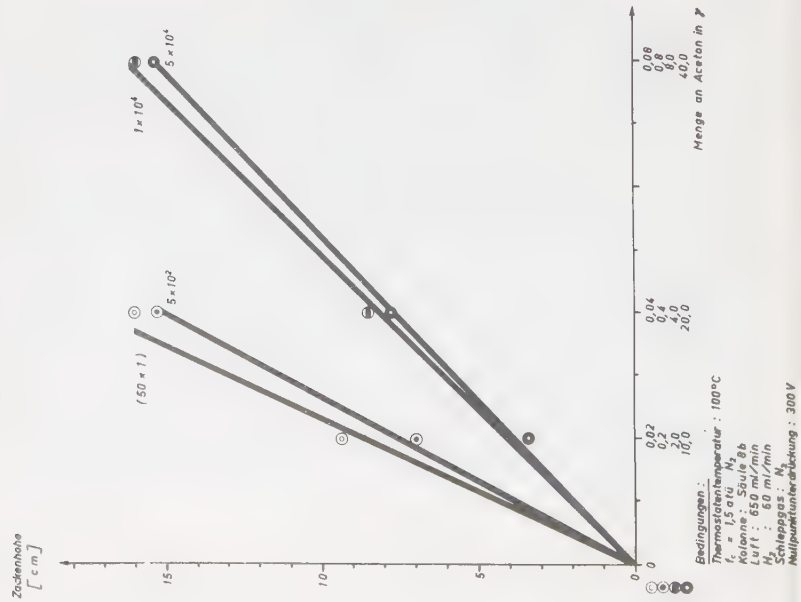
VII. 4) Ergebnisse der Untersuchungen.

Es wurden Vergiftungsfälle ausgewählt, die am hiesigen Institut im Jahre 1962 zur Sektion gekommen waren. Es handelte sich ausschließlich um männliche Leichen. Untersucht wurden Blut, sowie Leber und Gehirn. Die Blutseren wurden nach Denaturierung mit Bleinitrat und Zentrifugieren direkt eingespritzt, Leber und Gehirn zunächst der Wasserdampfdestillation unterworfen. Je 150g Organ wurden homogenisiert, mit 150 ml Aqua dest. und ca. 50g trockenem Natriumsulfat versetzt und im Wasserdampfstrom destilliert, bis ca. 300 ml Destillat übergegangen waren. Diese Menge wurde dann auf 50 ml und weiterhin auf 10 ml angereichert. Davon wurden entweder 5 - 20 µl direkt eingespritzt oder 2 ml Serum bzw. Destillat mit 1 ml n-Amylacetat ausgeschüttelt, und 5 - 20 µl des vom Wasser befreiten Zentrifugats auf die Silikonölkolonne aufgegeben.

Die untersuchten Fälle seien im folgenden kurz in chronologischer Reihenfolge mit stichwortartigen Auszügen der Sektions-

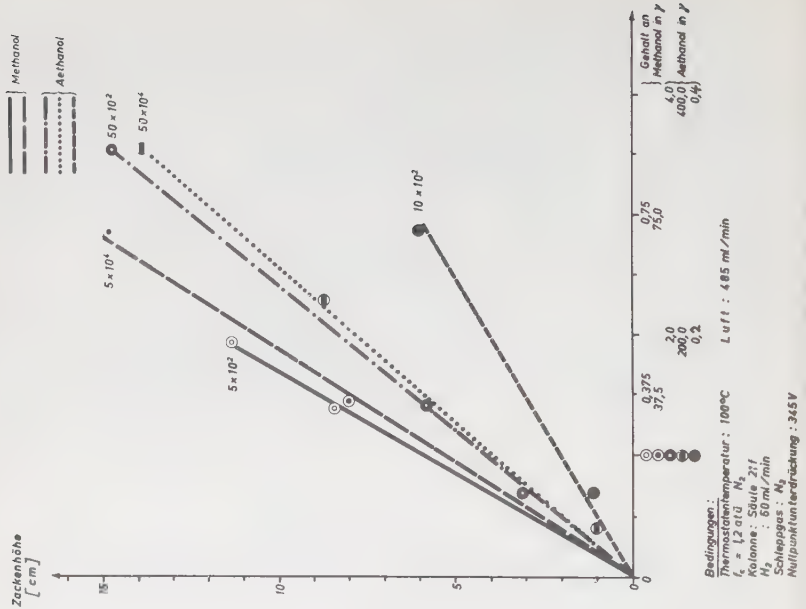
GRAPHIK 28

Eichkurve für Aceton



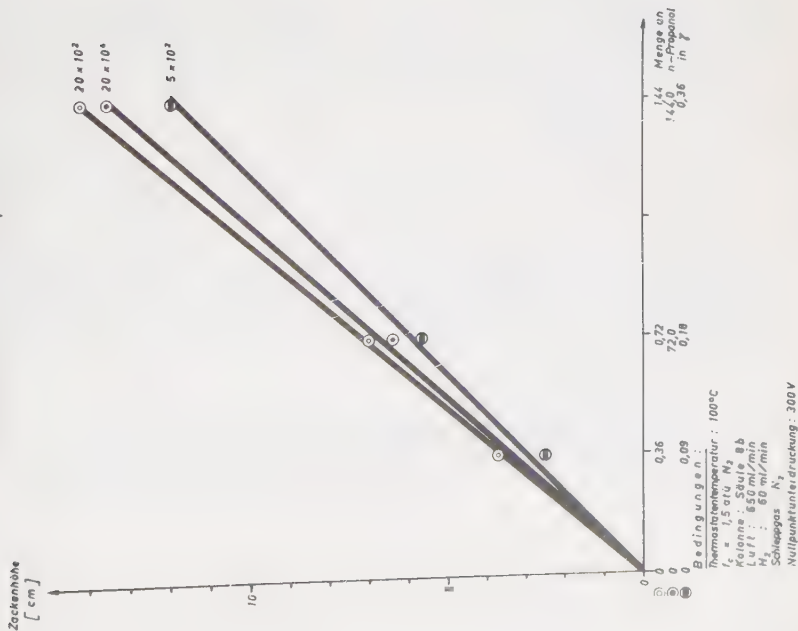
GRAPHIK 29

Eichkurve für Methanol und Aethanol



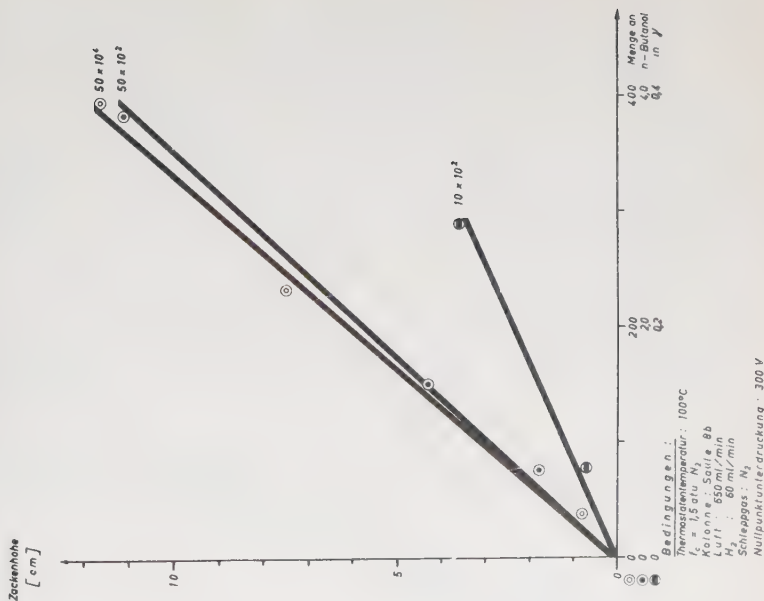
GRAPHIK 30

Eichkurve für n-Propanol



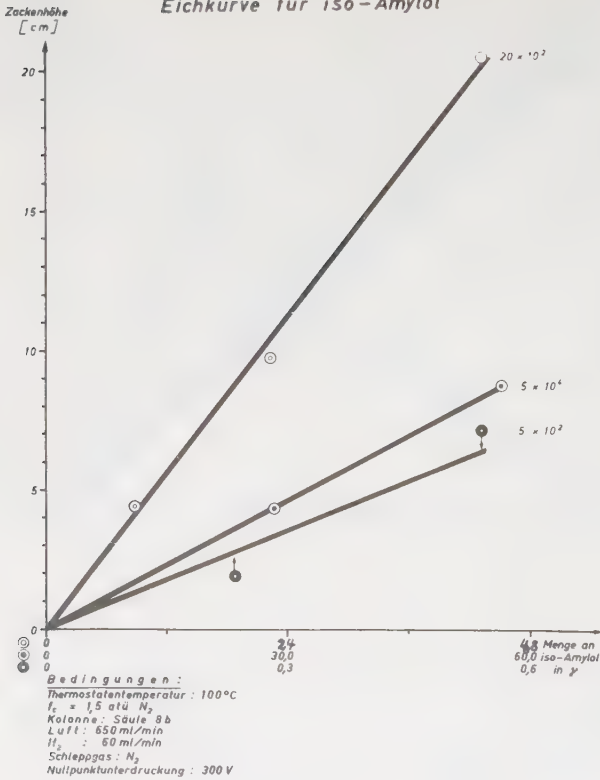
GRAPHIK 31

Eichkurve für n-Butanol



GRAPHIK 32

Eichkurve für iso-Amylöl



befunde, mit den Alkoholergebnissen nach ADH und Widmark, sowie den eigenen gaschromatographischen Ergebnissen (GC) dargestellt.

1.) I 30 / 62. (58 J.)

Tot auf dem Bürgersteig aufgefunden. Stark aromatischer Geruch des Gehirns und der Organe. Starker Blutreichtum der

Lungen. Chronische Stauung der großen Baueingeweide. Herzverfettung.

Blut: Widmark: 2,67 ‰, ADH: 2,37 ‰

Harn: Widmark: 3,22 ‰, ADH: 3,01 ‰

GC: Blut: 0,05 ‰ Aceton, 2,55 ‰ Aethanol, Spur n-Butanol

Gehirn: 0,05 ‰ Aceton, 2,2 ‰ Aethanol, Spur n-Butanol

Leber: 0,12 ‰ Aceton, 2,0 ‰ Aethanol, Spur n-Butanol

2.) L 104 / 62. (29 J.)

Wasserleiche, fortgeschrittene Fäulnis. Keine nachweisbaren krankhaften Befunde. Methanol negativ. Keine Kieselalgen nachweisbar.

Harn: Widmark: 0,56 ‰, ADH: 0,3 ‰

GC: Gehirn: 0,001 ‰ Aceton, 0,06 ‰ Aethanol, 0,002 ‰
n-Butanol

Blut: 0,01 ‰ Aethanol, Spur n-Butanol

Leber: o.B.

3.) L 189 / 62. (78 J.)

Notorischer Trinker. Stauung der inneren Organe als Zeichen raschen Kreislaufversagens. Intensiver aromatischer Geruch des Gehirns und der inneren Organe. Fettleber. Coronarsklerose.

Blut: Widmark: 2,77 ‰, ADH: 2,71 ‰

Harn: Widmark: 3,29 ‰, ADH: 3,43 ‰

GC: Blut: Spur Aceton, 2,55 ‰ Aethanol, Spur n-Propanol

Gehirn: 0,022 ‰ Aceton, 1,06 ‰ Aethanol, Spur n-Butanol
und n-Propanol

Leber: Spur Aceton, 2,2 ‰ Aethanol, Spur n-Propanol

4.) L 333 / 62. (64 J.)

Notorischer Trinker. Atrophie des Cortex. Intensiver aromatischer Geruch des Gehirns und der inneren Organe.

Blut: Widmark: 4,16 ‰, ADH: 4,37 ‰

Harn: Widmark: 4,58 ‰, ADH: 4,94 ‰

GC: Blut: 0,01 ‰ Aceton, 3,9 ‰ Aethanol, Spur n-Propanol,
n-Butanol u. iso-Amyl

Gehirn: 0,01 ‰ Aceton, 3,1 ‰ Aethanol, Spur iso-Amyl

Leber: 0,04 ‰ Aceton, 3,55 ‰ Aethanol, Spur sek-Butanol,
n-Propanol u. iso-Amyl

5.) L 350 / 62. (59 J.)

Treppensturz im Rausch. Stark adipös. Herzhypertrophie. Hirn- und Lungenödem. Intensiver aromatischer Geruch der inneren Organe.

Blut: Widmark: 2,5 ‰, ADH: 2,43 ‰

Harn: Widmark: 3,38‰, ADH: 3,29 ‰

GC: Blut: Spur Aceton (0,04 ‰), 2,3 ‰ Aethanol

Gehirn: 0,03 ‰ Aceton, 1,85 ‰ Aethanol, 0,0024 ‰ iso-Amyl

Leber: 0,13 ‰ Aceton, 1,4 ‰ Aethanol

6.) L 435 / 62. (36 J.)

Tot aufgefunden. Hirnschwellung. Lungenödem, Speisebrocken in der Luftröhre, fraglicher Tod durch Erstickung. Keine Anhaltspunkte für Vergiftung.

Blut: Widmark: 2,42 ‰, ADH: 2,30 ‰

Harn: Widmark: 2,19 ‰, ADH: 2,15 ‰

GC: Blut: 0,03 ‰ Aceton, 2,55 ‰ Aethanol, Spur iso-Amyl

Gehirn: 0,053 ‰ Aceton, 2,01 ‰ Aethanol, 0,004 ‰ iso-Amyl

Leber: 0,04 ‰ Aceton, 2,08 ‰ Aethanol

7.) L 468 / 62. (57 J.)

Trinker, tot im Bett aufgefunden. Intensiv aromatischer Geruch der inneren Organe. Coronarsklerose.

Blut: Widmark: 3,64 ‰, ADH: 3,39 ‰

Harn: Widmark: 5,10 ‰, ADH: 4,57 ‰

GC: Blut: Spur Aceton, 3,49 ‰ Aethanol, höhere Alkohole negativ

Gehirn: 0,025 ‰ Aceton, 2,71 ‰ Aethanol, " " "

Leber: 2,65 ‰ Aethanol " " "

8.) L 488 / 62. (53 J.)

Plötzlicher Tod im Rausch. Blutfülle innerer Organe und starker aromatischer Geruch. Lungenemphysem.

Blut: Widmark: 3,92 ‰, ADH: 3,99 ‰

Harn: Widmark: 4,15 ‰, ADH: 4,15 ‰

GC: Blut: 0,01 ‰ Aceton, 3,75 ‰ Aethanol, Spur iso-Amylöl

Gehirn: 0,05 ‰ Aceton, 2,55 ‰ Aethanol, Spur n-Propanol

Leber: Spur Aceton, 2,5 ‰ Aethanol, Spur Methanol, Spur iso-Amylöl

9.) L 498 / 62. (63 J.)

Trinker. Tod in der Badewanne. Aromatischer Geruch innerer Organe. Links-Hypertrophie. Mäßige Atheromatose. Schlafmittelvergiftung: insgesamt 1,594 g Diaethylbarbitursäure.

Blut: Widmark: 0,13 ‰, ADH: 0,00 ‰

Harn: Widmark: 0,64 ‰, ADH: 0,00 ‰

GC: Blut: 0,05 ‰ Aceton, 0,009 ‰ Aethanol, höhere Alkohole negativ

Gehirn: 0,01 ‰ Aceton, 0,05 ‰ Methanol, " " "

Leber: 0,4 ‰ Aceton, 0,06 ‰ Aethanol, " " "

10.) L 553 / 62. (67 J.)

Tot im Bett aufgefunden. Grün-faule Leiche. Allgemeine Atheromatose. Lungen- u. Hirnoedem. Fraglicher aromatischer Geruch des Gehirns.

Blut: ADH 0,9 ‰

Harn: Widmark: 1,18 ‰, ADH: 0,91 ‰

GC: Gehirn: Spur Aceton, 1,21 ‰ Aethanol, Spur n-Propanol

Leber: 0,01 ‰ Aceton, 1,5 ‰ Aethanol, 0,001 ‰ n-Propanol

11.) L 549 / 62. (59 J.)

Unglücksfall bei Selbstmordvorbereitung. Hirnoedem. Hyperämie der Lungen, Stauung der Bauchorgane. Stark aromatischer Geruch der inneren Organe.

Blut: Widmark: 2,39 ‰, ADH: 2,26 ‰

Harn: Widmark: 1,78 ‰, ADH: 1,45 ‰

GC: Blut: 0,05 ‰ Aceton, 2,15 ‰ Aethanol, Spur n-Propanol

Gehirn: Spur Aceton, 1,6 ‰ Aethanol

Leber: 0,075 ‰ Aceton, 1,54 ‰ Aethanol, Spur n-Propanol

VII. 5) Diskussion.

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, konnte in keinem Fall der Verdacht bestätigt werden, daß neben einer Alkoholintoxikation eine Vergiftung mit anderen flüchtigen Substanzen, namentlich mit Fuselalkoholen, bestand. Die gefundenen geringen Gehalte von höheren Alkoholen können evtl. auch durch beginnende Fäulnisprozesse erklärt werden.

Die Alkoholkonzentrationen nach Widmark und ADH schwankten zwischen 2,6 ‰ und 4,37 ‰ Aethanol, wenn man von denjenigen Fällen absieht, die wegen ihres stark aromatischen Geruchs trotz niedriger Aethanolgehalte zur Untersuchung kamen. Bei

den meisten Fällen lagen die Alkoholgehalte im Blut zwischen 2,2 und 3,3 ‰. Nur 2 Konzentrationen mit 3,99 ‰ und 3,47 ‰ waren ohne weiteres geeignet, einen plötzlichen letalen Ausgang zu erklären. Bei diesen hohen Gehalten, die einen entsprechenden Konsum an alkoholischen Getränken zur Voraussetzung haben, sollte jedoch untersucht werden, ob sich nicht eher Fuselalkohole nachweisen ließen.

Die Zahl der untersuchten Fälle war an sich klein, doch war die Zahl der während eines Jahres zur Untersuchung gekommenen Alkoholvergiftungen nicht wesentlich höher. Um zu genaueren Aussagen zu kommen, müßte die Zahl der untersuchten Fälle gesteigert werden. Auf Grund der bisherigen durchweg negativen Ergebnisse ist allerdings ein anderes Ergebnis kaum zu erwarten.

Betrachtet man die Untersuchungsergebnisse zusammenfassend, so fällt auf, daß nur in 2 Fällen Methanol und gewöhnlich nur 1 - 2 Fuselalkohole in Spuren ermittelt werden konnten. Nur in einem Fall traten im Leberdestillat 4 Fuselalkohole in geringen Mengen auf. Der am häufigsten vorkommende höhere Alkohol war n-Propanol (6mal), es folgten n-Butanol und iso-Amylol, die insgesamt 4mal in Spuren nachgewiesen werden konnten. Nur einmal trat sek.-Butanol auf. Gar nicht nachgewiesen werden konnten tert.-Butanol, iso-Butanol und iso-Propanol. Alle Fuselalkohole waren jedoch in so geringen Mengen vorhanden, daß kein forensisches Interesse bestand. Deshalb wurde auch häufig darauf verzichtet, genaue Gehaltsbestimmungen anhand der Eichkurven vorzunehmen, namentlich wenn diese Gehalte unter 0,001 ‰ lagen.

Häufig waren auch noch in sehr geringen Konzentrationen 2 unbekannte Substanzen vorhanden, deren Retentionszeiten auf Säule 8b bei 1'10" und 1'36" lagen. Da ein Vergleich mit Retentions-Werten bereits bekannter Substanzen keine Übereinstimmung ergab und die Konzentrationen noch unter denjenigen

der Fuselalkohole lagen, wurde auf eine Identifizierung verzichtet. Vermutlich handelte es sich um Abbauprodukte körpereigener Substanzen oder um Artefakte der Destillation.

Interessant war, daß in allen untersuchten Fällen Aceton in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Die Gehalte schwankten zwischen 0,001 % und 0,4 %. Bei der Höhe der Konzentration im Fall 9 war eine Mitbeteiligung des Acetons am letalen Ausgang zu vermuten. In den meisten anderen Fällen blieben jedoch auch die Acetonmengen ohne Belang.

Ihre Erklärung dürften sie in der Tatsache finden, daß bei notorischen Trinkern ein Stadium ohne feste Nahrungsaufnahme vorausgeht, das einem Hungerzustand gleichkommt. Nach Erschöpfung der Glykogenvorräte der Leber und Umschaltung der Stoffwechselprozesse auf den Abbau von Fett und Eiweiß kommt es zu einem Anstieg der Acetongehalte, die aus den mobilisierten Fettsäuren stammen. Die Acetonmengen lagen in fast allen Fällen in der Leber am höchsten und überstiegen in einigen Fällen bei weitem die im Blut und Gehirn gemessenen Werte. Dies kann mit der Tatsache erklärt werden, daß die Leber der alleinige Bildungsort der Ketokörper bei Hunger und Diabetes darstellt.

Bei Alkoholkonzentrationen, die für eine Erklärung des letalen Ausganges nicht ausreichen, muß also weiterhin auf histologische und physiologische Erklärungsmöglichkeiten der Todesursache zurückgegriffen werden. Starkes Anfluten von Aethanolgehalten über 2 % kann ausreichen, einen bereits geschädigten Kreislauf zum Erliegen zu bringen.

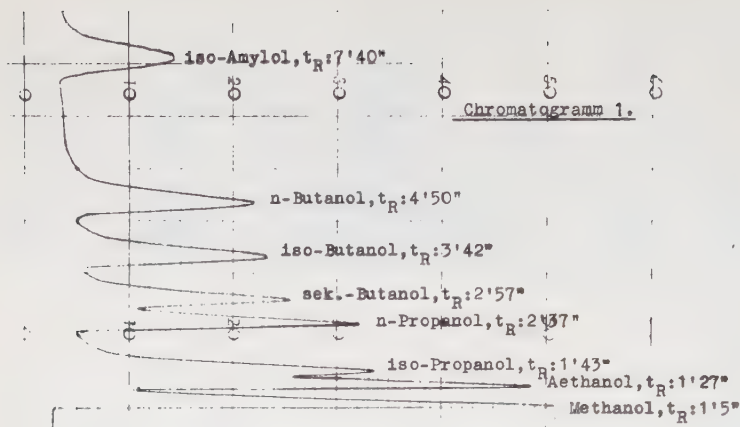
Tabelle der Säulen (Tab. 16)

Säulen-Nr.	Anteil der flüssigen Phase(n)	Anteil Sterechemol	Beladung	Solvens	Länge	Temperaturgrenze (°C)	Bemerkungen
	15% Plexol 8NS 10% Dodecylphthalat 3% Polyglycol				1,8 m	160°	Alkohol-Spezial-Kol. d. Fa. Beckman (Nr. 70025)
	Siliconöl 550				1,8 m	190°	Siliconöl-Kol. d. Fa. Beckman
1.	6,5 g Paraffinöl	13 g	33 1/3%	Chloroform	1,53 m	120°	apolare Säule
2.	3,6 g Polyglykol 1000 6,0 g "	14,4 g 24,1 g	20 % 20 %	Methanol	1,46 m 2,48 m	150°	
3.	4,0 g Diglycerin	16,0 g	20 %	"	1,46 m	150°	stärkste Selektion gegen Wasser
4.	5,73 g Trikrethylphosphat	15,3 g	27 %	Chloroform	1,46 m	160°	
5.	6,0 g Oxidipropionitril	14,0 g	30 %	"	1,50 m	100°	sehr niedrige Temp.-Grenze
6.	6,0 g Dinonylphthalat	14,0 g	30 %	"	1,50 m	100°	
7.	6,0 g Diglycerin 11,25 g " 8,0 g "	14,0 g 26,25 18,6 g	30 %	Methanol	1,60 m 3,00 m 2,00 m	150°	Säule für Abschn. VI (Schnellanalyse)
8.	3,0 g Diglycerin 3,0 g Polyglykol 1000 4,8 g Diglycerin 4,8 g Polyglykol 1000	14,0 g 22,4 g	30 %		1,45 m 2,2 m	150°	
8a	6 g Diglycerin 6 g Polyglykol 1000	28,0 g			3,0 m		
	1,0 g Diglycerin 1,0 g Polyglykol 1000	39,7 g	5 %	Methanol	3,00 m	150°	Übergang von GAC zu GVC
8b	1,5 g Diglycerin 1,5 g Polyglykol 1000	21,1 g 6,25 %	je	"	2,2 m	150°	Säule f. PID
9.	1,1 g Diglycerin	13,0 g	7,9 %	"	1,45 m	150°	
10.	6,0 g Sebacinsäure- äthylhexylester	14,0 g	30 %	"	1,50 m	150°	
11.	2,0 g Diglycerin 4,0 g Polyglykol 1000	14,0 g 20 %	10 % 30 %	"	1,48 m	150°	Vorläufer von Säule 32
12.	6,0 g Triäthylenglykol	14,0 g	30 %	"	1,48 m	100°	niedrige Temp.Grenze
13.	2,3 g Diglycerin 2,3 g Oxidipropionitril	12,9 g je 13,1 %	je 13,1 %	"	1,48 m	100°	dgl.

Fortsetzung Tab. 16

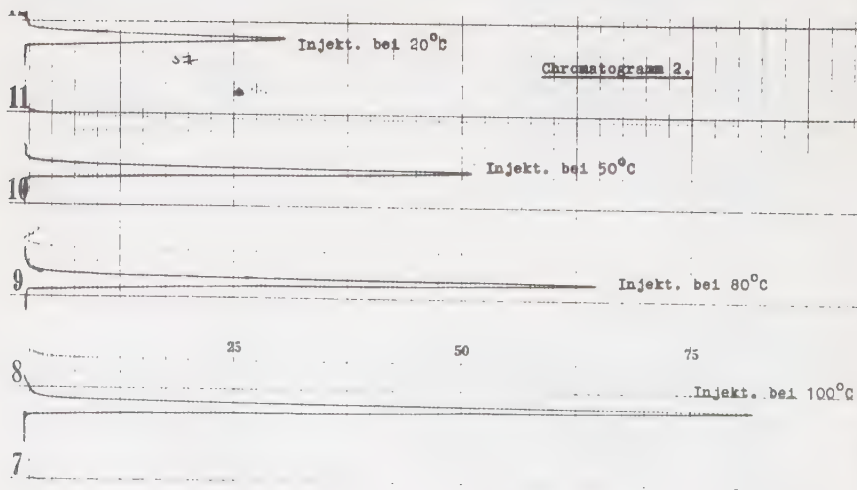
Säulen- Nr.	Anteil der flüssigen Phase(n)	Anteil Stercha- mol	Beladung	Solvens	Länge	Temperaturgrenze (°C)	Bemerkungen
14.	4,0 g Diglycerin 2,0 g Polyglykol 1000	14,0 g	20 % 10 %	Methanol	1,52 m	150°	
15.	6,53 g Flexol 8N8 12,0 g "	15,3 g 28,0 g	30 %	Aceton	1,55 m 3,00 m	190°	
16.	0,875 g Diglycerin 4,37 g Flexol 8N8	12,3 g	5 % 25 %	Methanol	1,51 m	150°	
17.	0,42 g Diglycerin 4,64 g Flexol 8N8	12,1 g	2,5 % 26,5 %	"	1,50 m	150°	
18.	0,54 g Polyglykol 1000 1,8 g Dinonylphthalat 2,7 g Flexol 8N8	13,0 g	3 % 10 % 15 %	"	1,50 m	150°	
19.	2,5 g Sebacinsäure- äthylester 2,8 g Flexol 8N8	14,0 g	je 14,3 %	"	1,48 m	150°	
20.	1,5 g Diglycerin 2,25 g Sebacinsäure- äthylhexylester 2,25 g Flexol 8N8	14,0 g	7,5 % je 11,25 %	"	1,55 m	150°	
21.	1,44 g Diglycerin 10,1 g Flexol 8N8	27,0 g	3,75 %	"	3,0 m	150°	
	1,0 g Diglycerin 7,0 g Flexol 8N8	18,66 g	26,1 %	"	2,1 m		
21f	1,0 g Diglycerin 6,0 g Flexol 8N8	28,0 g	2,86 % 17,1 %	"	2,3 m	150°	Säule f. FID
22.	6,0 g Diglycerin 6,0 g Oxidipropionitril	28,0 g	je 13,0 %	Chloroform	3,0 m	100°	niedrige Temp.-Grenze
23.	5,0 g Diglycerin 7,0 g Oxidipropionitril	28,0 g	12,5 % 17,5 %	Methanol	3,0 m	100°	dgl.
24.	1,0 g Diglycerin 11,0 g Flexol 8N8 0,66 g Diglycerin 7,33 g Flexol 8N8	28,0 g 18,66 g	2,5 % 27,5 %	"	3,0 m 2,0 m	150°	Vorläufer von Säule 21f
25.	2,03 g Diglycerin	18,25 g	10 %	"	2,1 m	150°	Säule f. Abschn. V.F

Skülen- Nr.	Anteil der flüssigen Phase(n)	Anteil Stercha- mol	Beladung	Lösens	Länge	Temperaturgrenze (°C)	Bemerkungen
26.	20,6 g Flexol 8NS	47,9 g	30 %	Methanol	5,4 m	190°	
27.	2,0 g Diglycerin 10,0 g Silicoöl (Fa. Merck)	28,0 g	5 % 25 %	Aethanol Chloroform	2,63 m	150°	Vorläufer von Säule 27a
27a	1,5 g Diglycerin 5,5 g Silicoöl (Fa. Merck)	28,0 g	3,75 % 13,75 %	Aceton	3,0 m	150°	Säule für FID
28.	7,95 g Paraffinöl	18,5 g	30 %	Chloroform	2,2 m	120°	Verlängerte Säule 1
28a	7,9 g Paraffinöl 2,87 g Diglycerin	24,4 g	21,8 % 8,2 %	Methanol Chloroform	2,2 m 0,8 m		enthält Diglyc. in einer Vorkolonne
28b	dgl.	"	"	"	3,0 m	"	Mischung beider Imprägnate
28c	dgl.	"	"	"	3,0	"	zunächst Diglycerin in Methanol gelöst und auf Sterchamol imprägniert, nach dem Trocknen Paraffin- öl in Chloroform gelöst und abgedampft auf Sterchamol imprägniert.
28d	dgl.	"	"	55 ml Methanol 145 ml Chloro- form	3,0 m	"	gemeinsame Imprägnie- rung apolare Kolonne für Tren- nungsgang (Abschn. VI)
29a	1,4 g Diglycerin 9,4 g Flexol 8NS	25,2 g	3,9 % 26,0 %	Methanol	3,0 m	150°	Mischung beider Imprägnate
29b	dgl.	"	"	"	3,0 m	"	gemeinsame Imprägnierung in gleichen Solvens
29c	dgl.	"	"	"	0,8 m 2,2 m	150°	enthält Diglycerin in einer Vorkolonne
30.	9,75 g Triäthylphosphat	22,25 g	30 %	Chloroform	2,5 m	160°	Vorsäule für Abschn. V, F
31.	3,72 g Diglycerin	8,68 g	30 %	Methanol	1,0 m	150°	Vorsäule für Abschn. V, E
31a	0,32 g Diglycerin	3,68 g	8 %	"	0,4 m	150°	Säule für Trennungsgang (Abschn. VI)
32	2,88 g Diglycerin 5,76 g Polyglykol 1000	20,15 g	10 % 20 %	"	2,2 m	150°	



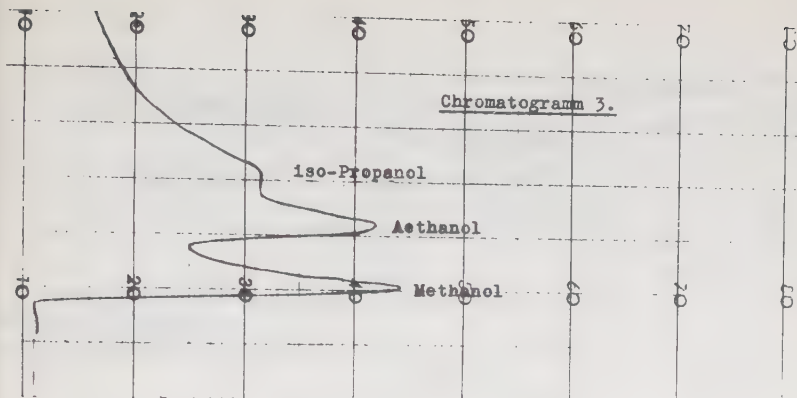
Bedingungen:

Thermostatentemp.: 130°C , fc: 1 atü, Kolonne: Nr. 70025 (Fa. Beckman)
 Detektorstrom: 300 mA, Empfindlichkeit: 50 x, Probe: 5 μl , Mischung
 aliquoter Teile der Reinsubstanzen.



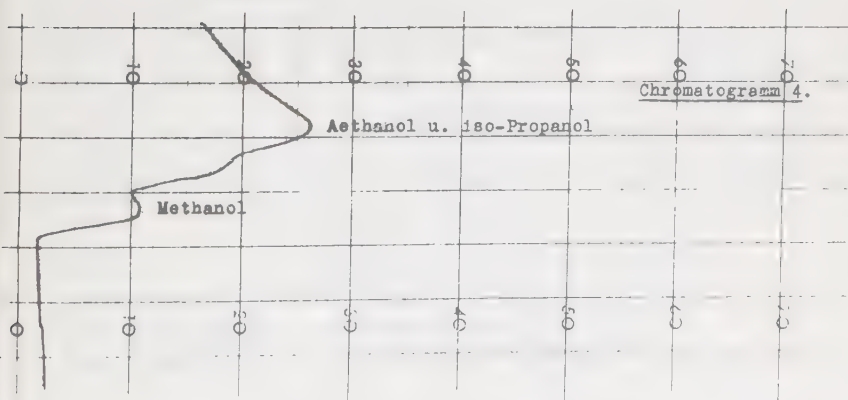
Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C , fc: 1,4 atü, Kolonne: Nr. 70025 (Fa. Beckman)
 Detektorstrom: 350 mA, Empfindlichkeit: 5 x, Probe: 5 μl Aethanol.



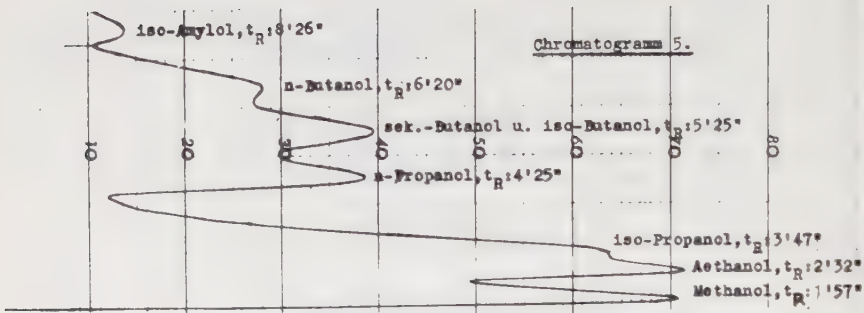
Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C, fc: 1 atü, Vorkolonne: 2 g CaH₂/Sterchamol,
 Kolonne: Nr. 70025 (Fa.Beckman), Detektorstrom: 300 mA,
 Empfindlichkeit: 1 x, Probe: 5 µl wässriger Testlösung (je ca. C,6%
 der Alkohole enthaltend)



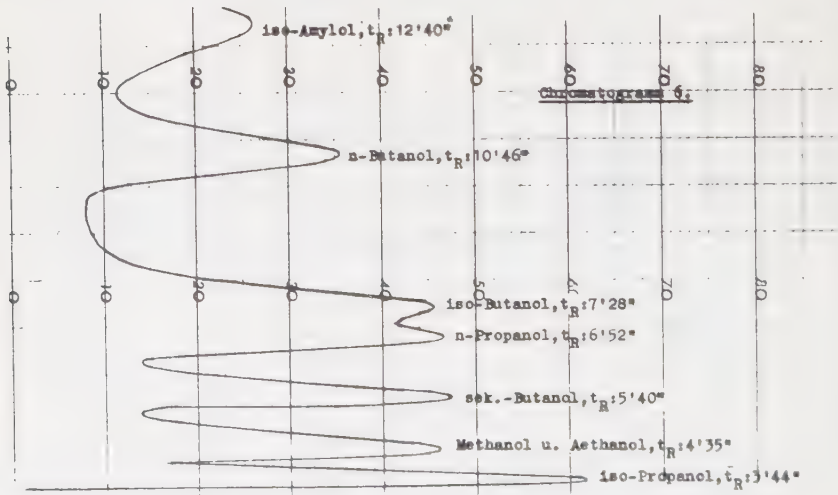
Bedingungen:

wie Chromatogr. 3, nach Injektion von 400 µl wässriger Testlösung.



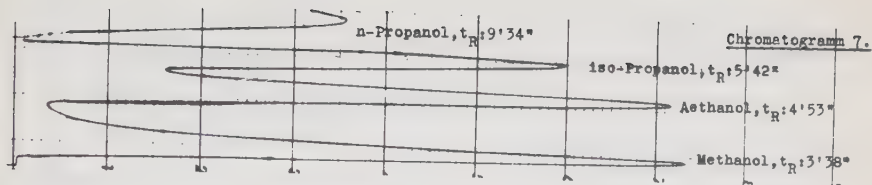
Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C , fc: 1 atü, Kolonne: Siliconölsäule (Fa. Beckman)
 Detektorstrom: 250 mA, Empfindlichkeit: 50 x, Probe: 20 μl , Mischung
 aliquoter Teile der Reinsubstanzen.



Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C , fc: 1,5 atü, Kolonne: Säule 8 (Länge: 3 m)
 Detektorstrom: 250 mA, Empfindlichkeit: 10 x, Probe: 20 μl , Mischung
 aliquoter Teile der Reinsubstanzen.

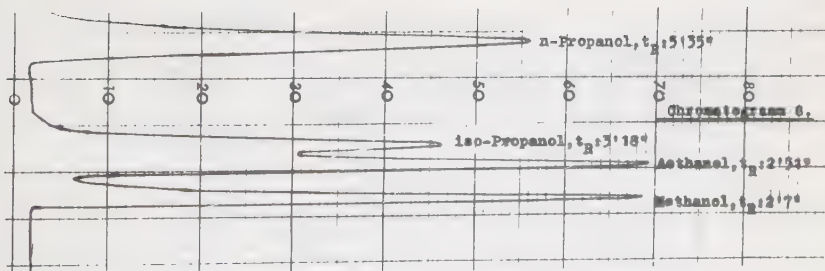


Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C, f_0 : 1,5 atü = 185 ml/min., Kolonne: Säule 21 (Länge: 3 m)

Detektorstrom: 300 mA, Empfindlichkeit: 10 x, Probe: 5 μ l, Mischung aliquoter

Teile der Reinsubstanzen.

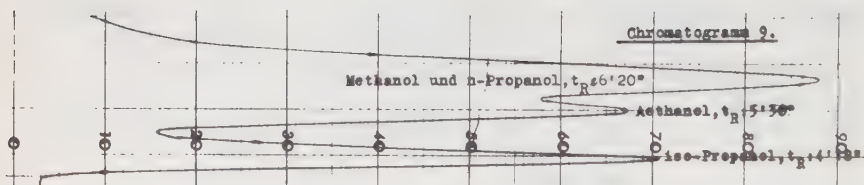


Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C, f_0 : 1,25 atü = 143 ml/min., Vorkolonne: 3' a,

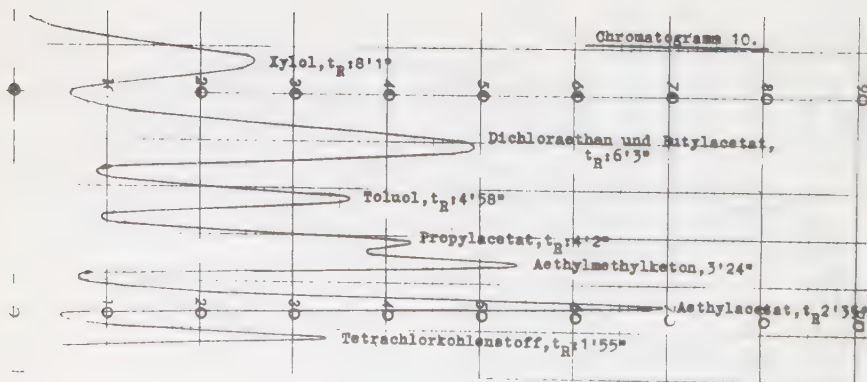
Kolonne: Nr. 70025 (Fa. Beckman), Detektorstrom: 400 mA,

Empfindlichkeit: 10 x, Probe: 5 μ l, Mischung aliquoter Teile der Alkohole.



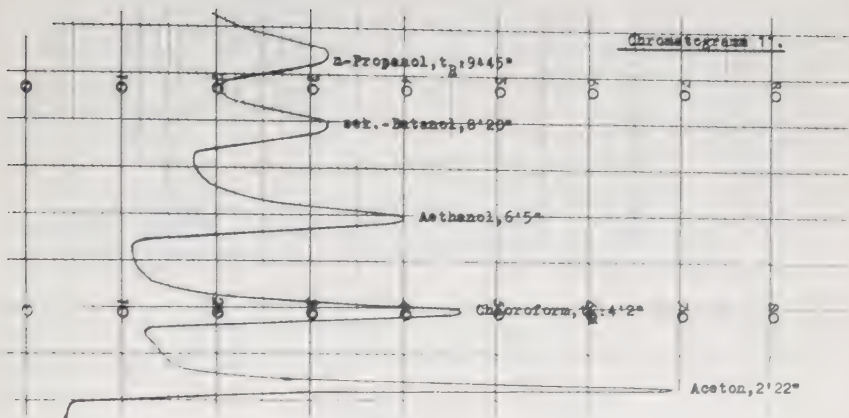
Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C , $f_c: 1,4 \text{ atü} = 165 \text{ ml/min.}$, Vorkolonne: Säule 31,
 Kolonne: Säule 25 (Länge: $2,1 \text{ m}$), Detektorstrom: 380 mA ,
 Empfindlichkeit: $1 \times$, Probe: $50 \mu\text{l}$ einer wässrigen Lösung, ca. $1,3\%$ der
 Alkohole enthaltend.



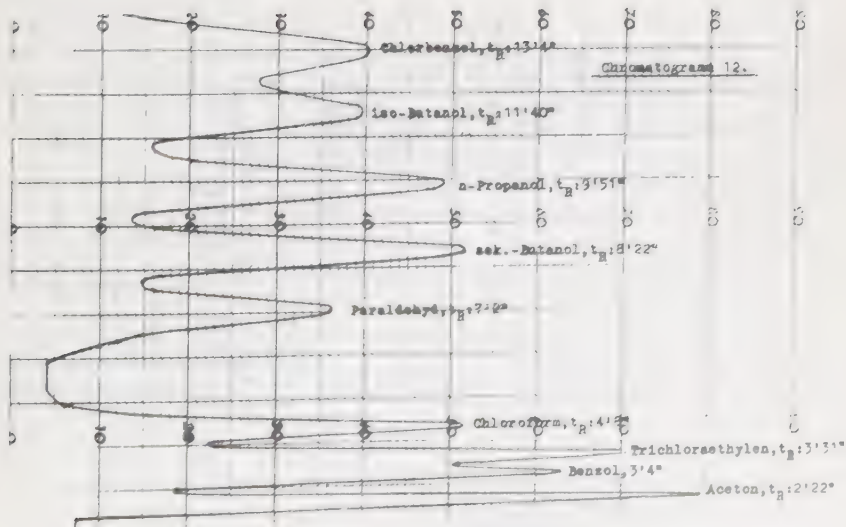
Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C , $f_c: 1,55 \text{ atü} = 165 \text{ ml/min.}$, Kolonne: 32,
 Detektorstrom: 400 mA , Empfindlichkeit: $1-2 \times$, Probe: $10 \mu\text{l}$, je ca.
 1% der Substanzen in Aether enthaltend.



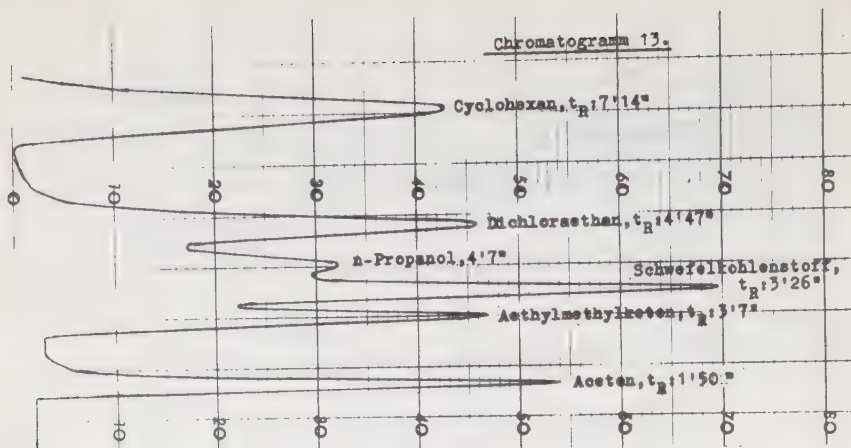
Bedingungen:

wie Chromatogramm 10.



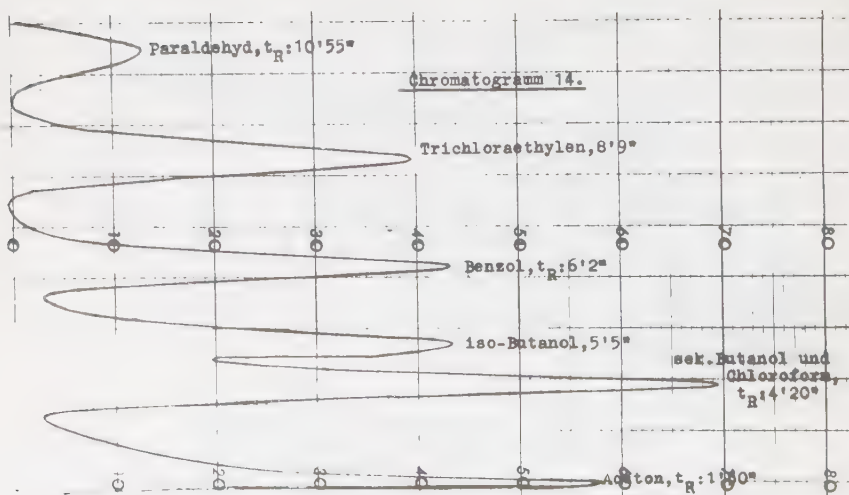
Bedingungen:

wie Chromatogr. 10.



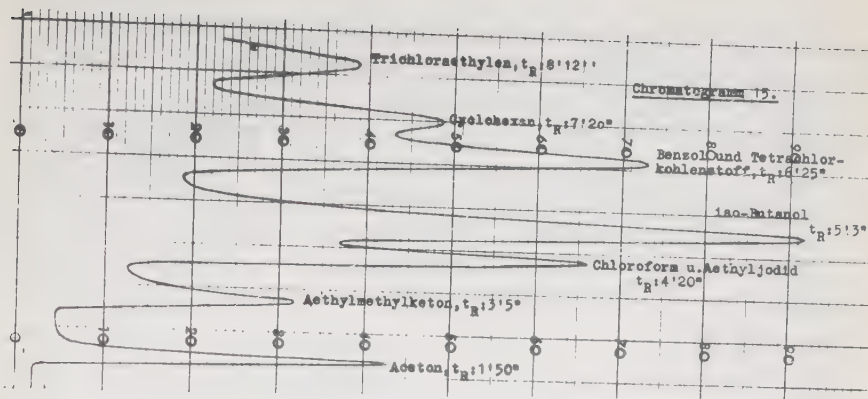
Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C , $f_c: 1,5 \text{ atü} = 185 \text{ ml/min.}$, Kolonne: Säule 28d,
 Detektorstrom: 300 mA, Empfindlichkeit: 1-5x, Probe: je ca. 0,7-0,95 %
 der Substanzen in Amylacetat.



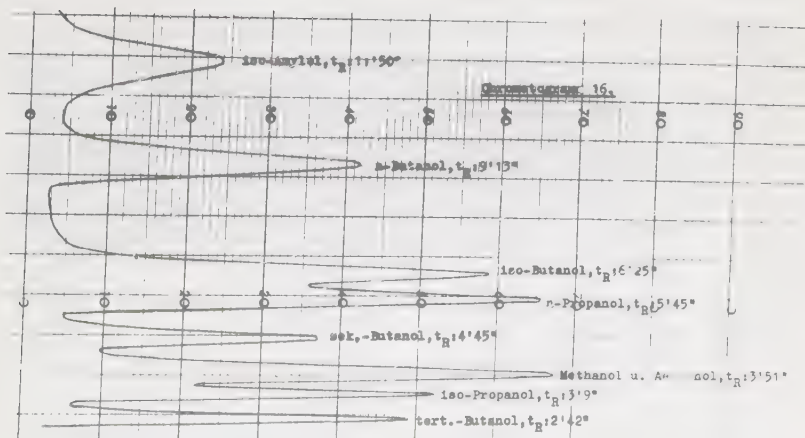
Bedingungen:

Detektorstrom: 400 mA, Empfindlichkeit: 1-5x, Probe: je ca. 0,8-1,2% der
 Substanzen in Amylacetat, sonst Bed. wie Chromatogr. 13.



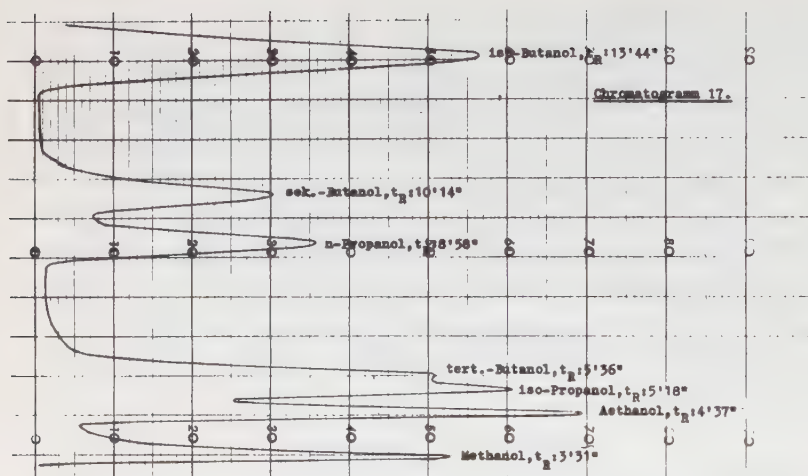
Bedingungen:

Detektorstrom: 400 mA, Empfindlichkeit: 1-2 x, Probe: je ca. 1 % der Substanzen in Aether, sonst Bed. wie Chromatogr. 13.



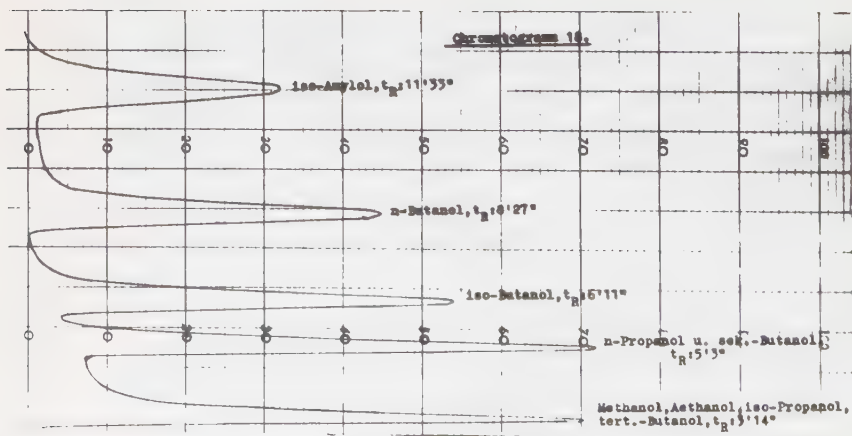
Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C, $f_0: 1 \text{ atü} = 57 \text{ ml/min.}$, Kolonne: 8 b, Detektorstrom: 300 mA, Empfindlichkeit: 2-5 x, Probe: 20 μl einer Testlösung ca. 2% der Substanzen enthalten.



Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C, f_c : 1,4 atü = 83 ml/min., Kolonne: Säule 21 f, Detektorstrom: 300 mA, Empfindlichkeit: 2-5 x, Probe: 20 µl einer Testlösung ca. 2% der Substanzen enthaltend.



Bedingungen:

Thermostatentemp.: 100°C, f_c : 1,1 atü = 55 ml/min., Kolonne: Säule 27 a, Detektorstrom: 380 mA, Empfindlichkeit: 2-5 x, Probe: 20 µl einer Testlösung ca. 2% der Substanzen enthaltend.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Zur Einarbeitung und Vorbereitung für die gaschromatographische Bestimmung von Blutalkohol waren orientierende Vorversuche zur Ermittlung optimaler Versuchsparameter mit dem Gaschromatographen GC2 (Fa. Beckman) erforderlich. Nach der Wahl des geeigneten Schleppgases (Wasserstoff) wurde eine Eichkurve aufgestellt, welche die Abhängigkeit des Schleppgasmengensstromes vom Kolonneneinlaßdruck wiedergibt. Die Abhängigkeit der Analysenzeit vom Druck und von der Temperatur wurde an einigen aliphatischen Alkoholen untersucht. Die Abhängigkeit der Zackenhöhe von der Stärke des Detektorstromes wurde ebenfalls graphisch dargestellt.

Da über die Abhängigkeit der Zackenhöhe und Zackenfläche von der Geschwindigkeit des Trägergasflusses (f_c) und der Thermostatentemperatur im Schrifttum widersprüchliche Angaben vorlagen, waren eigene Untersuchungen erforderlich. Dabei zeigte sich, daß die Zackenhöhe wesentlich stärker von der Temperatur beeinflußt wurde als die Zackenfläche. Die Höhe der Zacken erfuhr mit steigender Temperatur einen starken fast linearen Anstieg, während die Zackenfläche durch ein Maximum ging. Bei steigender f_c sanken dagegen sowohl Zackenhöhe als auch Zackenfläche ab. Während die Fläche jedoch zunächst steiler und danach in schwächerem Maße abfiel, war dies Verhalten bei der Zackenhöhe umgekehrt.

Als erster Schritt zur routinemäßigen Bestimmung von Blutalkohol erfolgte die Überprüfung des von CADMAN u. JOHNS (15) angegebenen Verfahrens, welches darauf beruht, daß der Äthylalkohol mit n-Propylacetat aus dem Blut extrahiert wird, und eine geringe Menge des mit dem Alkohol beladenen Lösungsmittels mit Hilfe einer Spezialkolonne gaschromatographisch analysiert wird. Nach allgemeinen Vorversuchen und der Aufstellung der benötigten Eichkurven wurde das Verfahren mit der Widmark- u. ADH-Methode verglichen und die Reproduzierbar

keit überprüft. Da die dreifache Abweichung (3s) bei $1,9\% \pm 0,12\%$ lag, also nahe der aus forensischen Gründen zu fordernden oberen zulässigen Grenze von $\pm 0,15\%$, und die Zeitdauer der recht umständlichen Bestimmungen zu lang erschien, wurde das Verfahren nicht weiter verfolgt. Die breiten Zacken des Ausschüttlungsmittels schränkten außerdem die gleichzeitige Erfassung anderer flüchtiger Substanzen stark ein.

Um den störenden Einfluß des Wassers bei der gaschromatographischen Bestimmung des Blutalkohols auszuschalten, wurde eine völlig neue Möglichkeit der Analyse ins Auge gefaßt. Es sollte versucht werden, den Alkoholgehalt der über dem Serum stehenden Luft nach Einstellung des durch den Alkohol-Partialdruck gegebenen Gleichgewichtes zu bestimmen und daraus den Blutalkoholgehalt zu errechnen. Zur Bindung des Wassergehaltes des Serums wurden einige Trockenmittel erprobt und auf ihr Adsorptionsvermögen für Aethanol geprüft. Ferner wurden Versuche zur Feststellung der optimalen Mengen der Trockenmittel und der günstigsten Temperaturen vorgenommen. Da der Wärmeleitfähigkeitsdetektor des Gerätes zu wenig empfindlich war, mußte mit entsprechend großen Gasmengen und hohen Detektorströmen gearbeitet werden, wodurch sich eine etwas zu große Streuung der Bestimmungen ergab. Da auch einige technische Schwierigkeiten auftraten, konnten die Erfolg versprechenden Versuche nicht weiter geführt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Bindung des Wassers bot die Gasreaktionschromatographie, wobei das Wasser chemisch umgesetzt wird. Die Versuche wurden mit Calciumhydrid und Aluminiumcarbid unternommen. Es stellte sich heraus, daß infolge der hohen Adsorptionskraft des Calciumhydrids und seiner Reaktionsprodukte erhebliche Alkoholverluste auftraten. Eine verstärkte Desorption des Aethanols durch Variation der Versuchsbedingungen (Steigerung der f_c und der Temperatur) war nicht zu erreichen. Auch das Verbacken des Calciumhydrids

im Verlaufe der Reaktion ließ sich selbst durch Zugabe großer Mengen inerte Träger nicht ganz vermeiden. Infolge der Veränderung der Oberfläche wurden die Versuchsparameter (vor allem die Geschwindigkeit des Trägergasflusses) bei jeder Probeaufgabe geringfügig verändert.

Nach diesen ungünstigen Ergebnissen wurde mit der Entwicklung eines eigenen gaschromatographischen Verfahrens begonnen, welches die direkte Analyse eingespritzter Serumproben ermöglichen sollte. Zu diesem Zwecke wurden Bedingungen zur Herstellung optimaler Säulenfüllungen untersucht und Vorschriften zur Herstellung von Säulen stark unterschiedlicher Polarität ausgearbeitet.

Da eine direkte Injektion von Serumproben in den Probestutzen des gaschromatographischen Gerätes nicht möglich war, wurde eine kleine Verdampfungskammer angefertigt, die mittels einer Heizplatte gesondert temperiert werden konnte und nach Lösen zweier Verschraubungen leicht herauszunehmen und zu reinigen war. Für die Enteiweißung der Seren wurde eine neue, für die Gaschromatographie geeignete Methode ausgearbeitet, die auf der Zugabe von festem Bleinitrat beruht.

Ferner wurden Kolonnen entwickelt, die zur Analyse wäßriger Proben der niedrigen aliphatischen Alkohole, speziell des Aethanols, geeignet waren. Für die Eliminierung des Wassers und die Analyse der Alkohole bis auf Methanol u. Aethanol wurde eine Polyglykol-Diglycerinkolonne (Säule 8) als geeignet gefunden. Die Trennung von Methanol und Aethanol gelang auf Säulen, deren Füllung aus Flexol-Diglycerin bestand (Säule 21 u. 24). Auch eine Kolonne mit reinem Diglycerin/Sterchamol erwies sich als ausreichend spezifisch für die Analyse des Blutalkohols (Säule 7).

Für die mit einer Diglycerin-Vorkolonne (Säule 31a) gekoppelte Kolonne Nr. 70025 (Fa. Beckman) wurden die Bedingungen für ein Routineverfahren ermittelt. Da aber die Vorsäule nur mit

kleinen Wasserproben belastbar war und ein genügend empfindlicher Detektor noch nicht zur Verfügung stand, wurde eine Säulenkombination benutzt, die aus einer höher beladenen Diglycerin-Vorkolonne zur quantitativen Retention des Wassers und einer Diglycerin-Hauptsäule zur Analyse des Aethanols bestand. Zwischen Vor- u. Hauptkolonne wurde ein Zwei-Kolonnenventil als Hahn geschaltet. Nach der Registrierung der Aethanolzacke wurde das Wasser aus der Vorkolonne durch Rückspülung entfernt. Für die Routineanalyse wird eine entsprechende Anordnung mehrerer Vorsäulen empfohlen, um die Analysenzeit abzukürzen.

Das vorgeschlagene Verfahren zeigte eine für forensische Zwecke ausreichend geringe Streuung. Es besaß neben seiner Spezifität für Aethanol außerdem den Vorzug einer gleichzeitigen qualitativen und quantitativen Bestimmung anderer im Blut vorhandener flüchtiger Substanzen (z.B. Methanol und Aceton). Weitere Vorzüge waren die einfache Ausführung, geringe laufende Kosten und insbesondere die automatische Registrierung und gleichzeitige Dokumentation der Ergebnisse.

In ihrem zweiten Teil befaßte sich die Arbeit mit der Entwicklung eines gaschromatographischen Trennungsganges zur Identifizierung flüchtiger Giftstoffe in Blut und Körperflüssigkeiten. Die Substanzen wurden durch Vergleich der Retentionszeiten an zwei Säulen unterschiedlicher Polarität identifiziert. Die polare Kolonne enthielt Diglycerin-Polyglykol/Sterchamol (Säule 32), die apolare Kolonne Paraffinöl-Diglycerin/Sterchamol (Säule 28 d).

Die Einschaltung einer Ausschüttelung der Substanzen mit n-Amylacetat erhöhte die Sicherheit der Aussage und setzte die Nachweisgrenze herab. Die Verwandung von n-Amylacetat ermöglichte die Anwendung einer Silikonölkolonne, deren apolarer Charakter stärker ausgeprägt und die im Trennverhalten der Paraffinöl-Diglycerin-Kolonne überlegen war.

Für eine Schnellanalyse wurde eine Kolonne (Säule 7) vorgeschlagen, die in nur 7 1/2 Min. den Ausschluß der Anwesenheit von 38 Substanzen des Trennungsganges im Analysenmaterial erlaubt.

Abschließende Untersuchungen galten der Feststellung von toxisch-wirkenden Begleitsubstanzen bei Aethanolvergiftungen. Wegen der benötigten Empfindlichkeit der Detektion wurde ein Flammenionisations-Detektor (FID) benutzt, für den optimale Versuchsbedingungen ermittelt wurden. Die bereits erstellten Säulen wurden für die Untersuchungen mit dem FID zweckentsprechend abgeändert.

Bei den Untersuchungen von Blutproben und Organteilen aus einer Anzahl von Leichen von Personen, bei denen Verdacht auf eine Aethylalkoholvergiftung bestand, konnten neben hohen Aethanolgehalten keine erheblichen Gehalte höherer Alkohole (Fuselöle) gefunden werden. Die ermittelten Konzentrationen waren ohne forensisches Interesse und nicht geeignet, eine Mitwirkung am letalen Ausgang zu erklären. Auffällig waren geringe Acetongehalte, für die eine physiologisch-chemische Erklärung gegeben wurde.

L i t e r a t u r

- 1.) R. Kaiser, Gaschromatographie. Akad.Verl.Gest. Geest
u. Portig Leipzig 1960
- 2.) E. Bayer, Gas-Chromatographie, Springer Verl. 1959
- 3.) A.I.M. Keulemanns, Gas-Chromatographie, Verl.Chemie,
Weinheim/Bergstr. 1959
- 4.) J.E. Fox, Chem. Zentralblatt. 130, 13902 (1959)
- 5.) B.Smith, " " 131, 13464 (1960)
- 6.) F. Drawert, G.Kupfer " 131, 13475 (1960)
- 7.) L.C. Browning, J.O. Watts, Analyt.Chemistry, 24 (1957)
- 8.) J.S. Bodmer, S.J. Mayeux " " , 1384 (1959)
- 9.) E.Weinig, L. Lautenbach, Arch. f. Krim. , 122,11
(1958)
- 10.) G. Machata, Arch. f. Toxikol. 18, 338 (1960)
- 11.) E. Wolthers, Acta Med. leg. (Liege), 9, 325 (1956)
- 12.) L. Mariq, L. Molle, Bull. Acad.roy.Belg. 6, 71 (1958)
- 13.) M. Feldstein, J. forensic.Sci. 5, 266 (1960)
- 14.) J.E. Zarembo, J.Lysyj, Z. anal. Chem. 176,136 (1960)
- 15.) S. Dietze, Beckman-Report. Heft 4, 6 (1959)
- 16.) H.S. Mahal, Analyt. Chemistry, 30, 1908 (1958)
- 17.) J.S. Fagerson, N.N. Nawar, Analyt. Chemistry, 32,
1534 (1960)
- 18.) P.S.Farington, Analyt. Chemistry, 31, 1512 (1959)
- 19.) H. Righi, Techn.Ber. Fa. Beckman - Instruments.
- 20.) Th. Johns, Beckman - Gas-Chromatography Applications
Manual.
- 21.) A.J. P. Martin, R.L.M. Synge, Biochem. J., 35, 1358
(1952)
- 22.) G.A. Vaughan, Analyst. 81, 55 (1956)
- 23.) R.P.W. Scott, Nature, 176, 793 (1955)
- 24.) G. Hesse, C.A., 45, 9335 b (1951)
- 25.) E. Cremer, F.Prior, C.A. 46, 5075 h (1951)
- 26.) E. Cremer, R. Müller, C.A. 45, 9335 a (1951)
- 27.) E. Glückauf, Disc. Farady Soc. 7, 12 (1949)
- 28.) E. Glückauf, J. Chem.Sci., 3280 (1949)
- 29.) S. Claesson, Disc. Farady Soc. 7, 321 (1950)
- 30.) G. Schomburg, Z. analyt. Chem. 189, 14 (1962)

- 31.) S. van de Craats, *Analyt. Chemistry*, 350 (1959)
- 32.) F. Silicio, *C.A.*, 1136 (1961)
- 33.) C.E. Bennet et al. *C.A.*, 13516 (1958)
- 34.) H. Oster, *Z. analyt. Chem.* 170, 265 (1959)
- 35.) W.J. de Wet, V. Praetorius, *Z. analyt. Chem.* 182, 84 (1961)
- 36.) B. Tschachotin, G. Hesse, *C.A.* 37, 6211 (1954)
- 37.) J. Janak, *C.A.*, 48, 3196 (1954)
- 38.) J. Janak, *Chem. Listy*, 47, 817 (1953)
- 39.) J. Janak, *C.A.* 48, 3197b (1954)
- 40.) H.W. Patton, S.J. Lewis, W.J. Kaye, *C.A.* 27, 170 (1955)
- 41.) E. Osterhaus, Referat Nr. 24 Kongress f. Gerichtsmed. (1962) Münster.
- 42.) G. Lius, H.W. Raudonat, *Dtsch. Z. f. gericht. Med.* 52, 241 (1962)
- 43.) U. Janitzki, *Dtsch. Z. f. gericht. Med.*, 52, 22 (1961)
- 44.) A. Zlatkis, J.F. Oro, *C.A.* 131, 3655 (1960)
- 45.) E. Bayer, *Angew. Chem.* 69732 (1957)
- 46.) A.A. Duswalt, W.W. Brandt, *Chem. Zentralbl.* 131, 10004 (1960)
- 47.) M. Singliar, J. Bride, A. Bobek, *Z. analyt. Chem.* 183, 137 (1962)
- 48.) J.T. Kung, J.E. Whitney, J.C. Cavagnol, *Analyt. Chemistry* 1505 (1961)
- 49.) A. Zlatkis, J.F. Oro, A.D. Kinbal, *Chem. Zentralbl.* 131, 11056 (1960)
- 50.) F. Drawert, R. Felgenhauer, G. Kupfer, *Angew. Chem.* 72, 555 (1960)
- 51.) F. Drawert, G. Kupfer, Hoppe - Seylers *Z. f. physiolog. Chem.* 329, 1 (1962)
- 52.) E. Bayer, K.H. Hupe, H.G. Witsch, *Angew. Chem.* 73, 525 (1961)
- 53.) J.J. Clark, *J. of Chromatogr.* 7, 4 (1962)
- 54.) G. Machata, *Mikroch. Acta* 4, 691 (1962)
- 55.) V.A. Sochelow, L.P. Kolesnikow, *C.A.* 56, 14904 (1962)
- 56.) H. Pfenninger, *Z. analyt. Chem.* 194, 301 (1963)
- 57.) M. Rogozinski, L.M. Shorr, A. Warshawsky, *J. of Chromatogr.* 8, 429 (1962)
- 58.) J.F. Haskin, et al. *Analyt. Chemistry*, 30, 217 (1958)

- 59.) R.N. Roberts, D. Shiengkong, J.Am.Chem. Soc. 82, 732 (1960)
- 60.) K.D. Parker, et al., Analyt.Chemistry, 1234 (1962)
- 61.) P.J. Porcaro, V.Johnston, Chem.Zentralbl., 13668 (1962)
- 62.) J.Matuwara, S. Kinoshita Z.analyt. Chem. 187, 380 (1962)
- 63.) M.Singliar, A. Bobek, J. Brida, L. Iukanovic, Z.analyt. Chem. 177, 161 (1961)
- 64.) J.R. Hunter, E.W. Cole, J.W. Pence, Z.analyt. Chem. 187, 380 (1962)
- 65.) R.N. Lacey, J.chem.soc., 1633 (1960)
- 66.) L.L. Browning, J.O. Watts, Analyt. Chemistry, 29, 24 (1957)
- 67.) J. Halsham, A.R. Jeffs, J.Appl. Chem. 7, 24 (1957)
- 68.) B.A. Rose, Analyst. 84, 574 (1959)
- 69.) A.H. Cook, Analyt. Chemistry, 1126 (1961)
- 70.) T. Salo, Z.analyt. Chem., 187, 203 (1962)
- 71.) B. Drews, H. Specht, " " , 189, 325 (1962)
- 72.) D. Jentsch, Z.analyt. Chem. 169, 300 (1959)
- 73.) M. Kieser, Nature, 185, 915 (1960)
- 74.) A. Heydrickx, E. Vandebus'sche, V.Coulier, Z.analyt. Chem. 191, 155 (1962)
- 75.) L. Molle, E.H. Vogelenzang, Pharmac. Weekblad, 93, 348 (1958)
- 76.) A.N. Korol, Z. analyt. Chem. 185, 156 (1962)
- 77.) H.Matamoto, Dtsch.Z.f.gericht. Med., 51, 263 (1961)
- 78.) B. Chundela, J. Janak, Z.analyt. Chem., 185, 165 (1962)
- 79.) P.A.T. Swoboda, Chem. and Industry, 1262 (1960)
- 80.) E. Weinig, W.Schwerd, L.Lautenbach, Beiträge zur gerichtl. Med. Band XXI (1961)
- 81.) E. Weinig, L.Lautenbach, Blutalkohol 1, 222 (1962)
- 82.) R.L. Martin, Z. analyt. Chem. 187, 122 (1962)
- 83.) H. Nicolaidies, Z. analyt. Chem. 184, 435 (1962)
- 84.) H.H. Hausdorfer, Chemikerzeitung, 81, 391 (1957)
- 85.) D. Ambrose, A.J.M.Keulemanns, J.H. Purnel, Analyt. Chemistry, 1582 (1959)
- 86.) K. Fuß, Beckman - Report, 2, 4, (1959)
- 87.) J. Janak, Z. analyt. Chemie, 180, 280 (1962)
- 88.) G. Awbor, " " , 160, 125 (1958)
- 89.) J.H. Karchmer, Chem. Zentralbl. 130, 16112 (1959)

- 90.) E. Purnell, G. Spencer, Chem.Zentralbl., 127, 4526 (1956)
- 91.) P.H. Todd, Z.analyt. Chem., 179, 138 (1960)
- 92.) F.H. Pollart, C.J. Hardy, Analytic. Chim.acta, 16,135 (1957)
- 93.) M. Singliar, Z. analyt. Chem., 177, 161 (1960)
- 94.) M. Kubinowa, Z. analyt. Chem., 180, 232 (1961)
- 95.) R. Collins, M.Morgan, Science, 131, 933 (1960)
- 96.) G. Scholz, Z.analyt. Chem., 181, 390 (1961)
- 97.) R.A. Butler, D.W. Hill, Nature, 189, 488 (1960)
- 98.) L. Maricq, L. Molle, Z. analyt. Chemie, 185, 255, (1962)
- 99.) A.N. Korol, Z. analyt. Chemie, 185, 158 (1962)
- 100.) M. Singliar, A. Bobek, J. Bride, Z. analyt. Chemie., 177, 161 (1961)
- 101.) P.J. Porcaro, Z. analyt. Chemie, 187, 203 (1962)
- 102.) G. Schwenker, Arch. f. Pharm. 294, 661 (1961)
- 103.) J.R. Pilleri, M. v.Michelia, Chem.Zentralbl.131, 10700 (1960)
- 104.) J. Romovacek, Z. Novotny, Z. analyt. Chem., 187, 364 (1962)
- 105.) A.W. Decora, G.U. Dineen, Chem. Zentralbl., 131, 11057 (1960)
- 106.) G. Machata, Arch.f.Toxikol, 18, 338 (1960)
- 107.) K.J. Bombaugh, W.C. Bull, Analyt. Chemistry, 1227 (1962)
- 108.) M. Feldstein, Z. analyt. Chem. 182, 240 (1962)
- 109.) L.R. Durrel, " " 182, 201 (1961)
- 110.) G. Eglinton, " " 173, 423 (1960)
- 111.) F. Fukuda, T.Omori, " 175, 284 (1960)
- 112.) M. Hvrinag, " 172, 216 (1960)
- 113.) J. Janak, M. Hvrinag, " 181, 280 (1961)
- 114.) U. Lapiere, J. Versie, " 171, 385 (1959)
- 115.) J.W. Rolls, " 178, 374 (1961)
- 116.) J. Sverka, P.L. Reiser, Z. analyt. Chem. 164, 338 (1958)
- 117.) J. Janak, Chem. Zentralbl. 130, 14210 (1959)
- 118.) E.G. Hoffmann, C.A., 6870, (1959)
- 119.) A.J. Keulemanns, A. Kwambas, P. Zaal, Z. analyt. Chem., 152, 216 (1956)

- 120.) G. Machata, Z. analyt. Chem., 183, 160 (1961)
- 121.) Th. Johns, W.J. Cadman, Dtsch.Z.f.gerichtl.Med.,
52, 126 (1961)
- 122.) B. Chundela, J. Janak, " " " " ,
51, 678, (1961)
- 123.) J. Brown, Nature, 188, 1021 (1962)
- 124.) J.S. Lewis, L. Patton, J. Kaye, Analyt. Chemistry,
1370 (1956)
- 125.) L. Rohrschneider, Z. analyt. Chem., 170, 256,
(1959)
- 126.) H.J. Maier, O.C. Karpthy, J. of. Chromatogr. 8,
308 (1962)
- 127.) D. Jentsch, K. Friedrich, Z. analyt. Chem., 180,
96 (1961)
- 128.) R.A. Dewar, Z.analyt. Chem., 191, 137 (1962)
- 129.) E. Weinig, L. Lautenbach, Arch.f.Krim. 122, 11 (1958)
- 130.) W. Schwerd, C.L. Garhammer, Dtsch.Z.f.gerichtl.Med.
42, 75 (1958)
- 131.) J. Rodier, Dtsch.Z.f.gerichtl.Med., 51, 99 (1961)
- 132.) H. Wolters, " " " " , 48,803 (1958)
- 133.) K. Jarosch, " " " " , 53,170 (1962)
- 134.) W. Grab, Arzneimittel - Forsch. 2, 73 (1961)
- 135.) W.Schwerd, Deutsch.Z.f.gerichtl.Med., 43, 221 (1958)
- 136.) J. Bohmann, et al. C.A. 2135, (1961)
- 137.) G.Machata, Referat auf d.Kongreß f.Gerichtsmed. 1963
(München).

Lebenslauf

Als Sohn des Marinestabsingenieurs Gottwald Zindler wurde ich am 25. November 1935 in Kiel geboren. Infolge Versetzung meines Vaters verzogen wir 1941 nach Berlin, wo ich ein Jahr danach in die Grundschule aufgenommen wurde. Im März 1955 bestand ich die Reifeprüfung an der Humboldtschule in Berlin-Tegel und trat im April des gleichen Jahres als Praktikant in die Askanier-Apotheke in Berlin-Spandau ein. Die praktische Ausbildung beendete ich im März 1957 mit dem pharmazeutischen Vorexamen. Im Sommersemester 1957 begann ich das Studium der Pharmazie an der FU - Berlin. Meine Hochschullehrer waren: Prof. Schenck (Pharmazeutische Chemie), Prof. Drawert und Prof. Werdermann (Botanik), Prof. Hänsel (Pharmakognosie), Prof. Vidic (Toxikologie), Prof. Jahr (Anorganische Chemie), Prof. Lautsch (Organische Chemie), Prof. Lassen (Physik), Prof. Schulte (pharmazeutische Technologie) und Dr. Koransky (Pharmakologie). Im Frühjahr 1960 bestand ich das Staatsexamen und begann Anfang Dezember des gleichen Jahres die Arbeit an der Dissertation im toxikologischen Labor des Instituts für Gerichtsmedizin der FU - Berlin unter Leitung von Prof. Dr. E. Vidic.

